

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Cristina Cunha Villar

CIRURGIÃ DENTISTA

**Relação do fumo com aspectos clínicos, radiográficos,
morfométricos e imuno-histoquímicos do periodonto.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica na Área
de Periodontia.

PIRACICABA

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Cristina Cunha Villar

CIRURGIÃ DENTISTA

**Relação do fumo com aspectos clínicos, radiográficos,
morfométricos e imuno-histoquímicos do periodonto.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica na Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima

Banca examinadora: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho

Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes

PIRACICABA

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 17/04/02

Assinatura do Orientador

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
V712r
V EX
TOMBO BC/ 49343
PROC 16.837/02
C Dx
PREÇO R\$ 11,00
DATA 04/06/02
Nº CPD

CM00168278-2

BIB ID 242739

Ficha Catalográfica

V712r Villar, Cristina Cunha.
Relação do fumo com aspectos clínicos, radiográficos, morfométricos e imuno-histoquímicos do periodonto. / Cristina Cunha Villar. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
x, 71f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Inflamação. 2. Imunohistoquímica. 3. Periodontia. I. Lima, Antonio Fernando Martorelli de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 01 de Março de 2002, considerou a candidata CRISTINA CUNHA VILLAR aprovada.

1. Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO MARTORELLI DE LIMA

2. Profa. Dra. DANIELA BAZAN PALIOTO

3. Prof. Dr. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

2003224542

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Isabel e José Francisco pelo imenso amor, incentivo, apoio e compreensão. Agradeço a vocês por tudo que sou.

A minha avó Maria Antônia, exemplo de vida e força, que muito me incentiva, torce e ora pelos meus objetivos.

Aos meus irmãos Luciana e Luís Fernando, que enchem meu coração de amor e orgulho e que tanto torcem por mim.

Ao Gustavo que sempre se faz presente com seu amor, apoio, carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Doutor Antonio Fernando Martorelli de Lima,
grande exemplo de dedicação e perseverança, meu sincero agradecimento
por sua orientação e apoio.

Ao Prof. Dr. Hermano de Medeiros Ferreira Tavares, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

A Prof^a. Dr^a. Altair Antoninha Del Bel Cury, Coordenadora de Pós-graduação e à Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo A. Gomes, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

Aos Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Prof. Dr. Sérgio de Toledo, Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum e Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, da Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, pela participação na minha formação acadêmica.

À Área de Patologia dessa faculdade na pessoa do Prof Dr. Oslei Paes de Almeida, pela disponibilidade de utilização do laboratório.

À Ana Cristina do Amaral Godoy, da Área de Patologia, pela colaboração na parte experimental deste trabalho.

Aos Prof. Pedro Duarte Novaes e Prof^a. Silvana Pereira Barros, do Departamento de Morfologia, pelo auxílio na documentação fotográfica.

A Profª. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pelo suporte estatístico.

À Fernanda da Roz Rodrigues pelo auxílio durante a parte experimental.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica - Área de Periodontia, em especial aos amigos Robert Carvalho Silva e Julio Cesar Joly pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Às amigas Fabiana Mantovani Gomes França Carolina Drummond Correa e Daniela Bazan Palioto pela amizade sincera e constantes conselhos.

Aos meus primos e amigos Laura Pereira Robles, Fábio Renato Pereira Robles e Flávia Maria Pereira Robles.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Capítulos	8
Capítulo 2.1 – A relação do fumo com a profundidade de sondagem, densidade ótica e posição da crista óssea alveolar – ABO nacional	8
Resumo	8
Introdução	9
Material e Métodos	11
Resultados	16
Discussão	20
Conclusão	23
Abstract	24
Referências Bibliográficas	25
Capítulo 2.2 – A influência do fumo na espessura epitelial da gengiva marginal – Pesquisa Odontológica Brasileira	28
Resumo	28
Introdução	29
Material e Métodos	30
Resultados	33
Discussão	38
Conclusão	40
Abstract	40
Referências Bibliográficas	41
Capítulo 2.3 - Análise imuno-histoquímica e morfométrica dos linfócitos na gengivite do fumante - Journal of Periodontology	44
Resumo	44
Introdução	45
Material e Métodos	46
Resultados	50
Discussão	55
Conclusão	58
Abstract	59
Referências Bibliográficas	60
3. Conclusão	61
4. Referências Bibliográficas	62
Apêndice	66

RESUMO

As características clínicas, radiográficas, morfométricas e imuno-histoquímicas, bem como, a diminuição dos sinais inflamatórios, a maior prevalência e severidade da doença e as interferências no processo de cura decorrentes dos efeitos do fumo sobre o periodonto são essenciais para estabelecer o diagnóstico e definir a terapia adequada. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a profundidade de sondagem, a posição da crista óssea alveolar e a densidade ótica radiográfica, e quantificar as células inflamatórias e a espessura epitelial, em pacientes fumantes e não fumantes com gengiva clinicamente saudável ou gengivite. Nossos resultados mostraram aumento na espessura da base epitelial e na profundidade de sondagem nos pacientes fumantes, principalmente naqueles com gengivite. Entretanto, não houve diferença estatística significativa no número de células inflamatórias presentes na gengiva marginal, na densidade ótica e na posição da crista óssea alveolar entre pacientes fumantes e não fumantes, independente do estado clínico de saúde. Esses resultados sugerem a necessidade de estudos futuros com populações adultas usuárias de tabaco para a melhor compreensão da influência do fumo na patogênese da doença periodontal.

ABSTRACT

The clinic, radiographic, morphometric and immunohistochemical characteristics of the periodontal tissues as well as higher prevalence and severity of the periodontal disease in smokers are essential for its diagnosis and therapy definition. Therefore, the aim of this study was to evaluate the probing depth, the position and the optical density of the alveolar bone crest and quantify the inflammatory cells and the epithelial thickness in smoker and non-smoker patients having clinical health gingiva or gingivitis. Results, in the present study showed a thicker oral epithelium of the marginal gingival oral epithelium and a deeper probing depth in smokers, especially in those presenting gingivitis. However, there were no statistic difference among the number of inflammatory cells presents in the marginal gingiva, the optical density and position of alveolar bone crest in smokers and non-smokers, regardless of their clinical health status. In conclusion further investigation, using patients who have been smoking for a longer period of time is necessary for a better understand of the smoking influence on the pathogeneses of periodontal disease.

1. INTRODUÇÃO

O tabagismo constitui fator de risco prognóstico para uma série de doenças. Na Europa o tabaco é responsável por 40.000 mortes anuais por câncer, e se forem incluídas as doenças coronarianas e pulmonares, o fumo é responsável por um milhão de mortes ao ano (BERGSTRÖM e PREBER, 1994). A influência do tabaco na saúde bucal é demonstrada pelo estabelecimento e desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas, maior prevalência de cáries e atraso na cicatrização tecidual após procedimentos cirúrgicos (MECKLENBURG e GROSSI, 2000). Com relação à saúde periodontal a discussão tem sido ampla. Embora a participação do tabaco como fator de risco não esteja claramente demonstrada, o fumo parece modificar a prevalência e a progressão das doenças periodontais (BERGSTRÖM e PREBER, 1994).

Os efeitos deletérios do fumo na saúde periodontal incluem alterações biológicas da resposta imunológica celular e humoral, provocando efeito imunossupressor e prejudicando a relação hospedeiro-parasita. Entre as alterações imunológicas deve ser destacado o prejuízo na mobilização, quimiotaxia e função fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico com comprometimento da linha primária de defesa contra bactérias subgengivais (MECKLENBURG e GROSSI, 2000). Os fumantes apresentam alteração na proporção de linfócitos T do sangue periférico, com diminuição de linfócitos helper e aumento de linfócitos citotóxicos e apresentam diminuição da produção de anticorpos, principalmente de IgG2, a classe mais importante das imunoglobulinas

envolvidas na opsonização de periodontopatógenos (MECKLENBURG e GROSSI, 2000). As modificações do sistema imune relativas ao tabagismo permitem que os microrganismos associados às doenças periodontais escapem dos mecanismos específicos e inespecíficos de defesa (MECKLENBURG e GROSSI, 2000).

Dentre as substâncias vasoativas do cigarro, destaca-se a cotinina, um dos derivados metabólicos da nicotina (MECKLENBURG e GROSSI, 2000). A constrição dos vasos sangüíneos periféricos do tecido gengival gera implicações de ordem inflamatória e possivelmente imunológica, além de diminuir a oxigenação e nutrição tecidual, provocando menor renovação celular (MECKLENBURG e GROSSI, 2000).

A diminuição da tensão local de oxigênio no ambiente subgengival e a maior adesão bacteriana às células epiteliais provocadas pelo tabaco propiciam o crescimento de periodontopatógenos anaeróbios (MECKLENBURG e GROSSI, 2000). Estudos clínicos falham em demonstrar alterações qualitativas e quantitativas na microbiota de pacientes fumantes: o acúmulo do biofilme bacteriano é descrito como menor (FELDMAN, BRAVACOS e ROSE, 1983), igual (BERGSTRÖM, 1981; BERGSTRÖM, et al., 1990) ou maior nos fumantes (PREBER, KANT e BERGSTROM, 1980) e a composição da microbiota subgengival pode variar entre semelhante (STOLTENBERG et al., 1993) e distinta da encontrada em pacientes não fumantes (ZAMBON et al., 1996).

A cotinina pode ser encontrada no soro, na saliva e no fluido gengival de pacientes fumantes (McGUIRE et al. 1989). CUFF et al. (1989) demonstraram ser possível a absorção de nicotina pela superfície radicular de fumantes com doença

periodontal. Fibroblastos expostos à nicotina mostram redução da proliferação, migração e adesão à superfície radicular, além de desenvolvem receptores de superfície que permitem a ligação e internalização da nicotina no citoplasma (RAULIN et al., 1988; HANES, SCHUSTER e LUBAS, 1991). Essas alterações provocam prejuízo no metabolismo celular, verificado pela redução da secreção de proteínas e síntese de fibras colágenas por essas células (MECKLENBURG e GROSSI, 2000).

As alterações imunológicas, inflamatórias, microbiológicas e citotóxicas associadas ao tabagismo interferem no quadro clínico, de forma a modificar a sintomatologia, a severidade e a resposta a terapia da doença periodontal. Diversos estudos tentaram determinar os efeitos do fumo nos tecidos periodontais, relacionando o hábito com a redução dos sinais inflamatórios, com a maior gravidade da doença periodontal, com o maior número de dentes perdidos e com o fracasso da terapia periodontal (ARNO et al., 1959; BERGSTRÖM e FLODERUS-MYRHED, 1983; BERGSTRÖM e PREBER, 1984; CUFF et al., 1989; GROSSI et al., 1997).

A resposta inflamatória induzida a partir do acúmulo do biofilme dental é modificada pelo fumo, como demonstraram BERGSTRÖM e PREBER (1986). Independente do grau de higiene oral, os fumantes apresentam redução dos sinais clínicos da inflamação como sangramento, vermelhidão, exudação e edema. Além de modificar os sinais clínicos inflamatórios, o fumo tem sido associado a maior prevalência e severidade de destruição periodontal, incluindo aumento na profundidade de sondagem, na reabsorção do osso alveolar e na perda de

inserção (ARNO et al., 1959; BERGSTRÖM e FLODERUS-MYRHED, 1983; GROSSI et al., 1997; HABER et al., 1993), e esses efeitos podem ser influenciados pelo número de cigarros consumidos e duração do hábito (BERGSTRÖM e ELIASSON, 1987). O efeito do fumo sobre a crista óssea alveolar pode não estar acompanhado de sinais clínicos evidentes da doença periodontal (BERGSTRÖM e ELIASSON, 1987).

A resposta clínica às diversas formas de terapia periodontal é inferior nos pacientes fumantes em relação aos não fumantes (MECKLENBURG e GROSSI, 2000). Em fumantes, a terapia mecânica não cirúrgica não é capaz de eliminar *B. forsythus* e *P. gingivalis* (GROSSI et al., 1994) e a terapia cirúrgica resulta em menor redução da profundidade de sondagem e menor ganho clínico de inserção (PREBER e BERGSTROM, 1986). O fumo está associado a 80% dos casos de fracasso no tratamento das lesões de bifurcação (ROSENBERG e CUTLER, 1994), à diminuição na taxa de recobrimento radicular (MILLER, 1987) e a redução da cicatrização após diversas formas de tratamento periodontal (TONETTI, PINI-PRATO e CORTELLINI, 1995).

Os estudos de avaliação do nível da crista óssea entre jovens fumantes e não fumantes falharam em encontrar diferenças entre os pacientes (PREBER, KANT e BERGSTROM, 1980). Isso pode ser atribuído a dificuldade em se identificar alterações sutis com os métodos radiográficos convencionais disponíveis.

Em periodontia, a maior parte dos estudos desenvolvidos avaliou pacientes adultos fumantes, com doença periodontal destrutiva instalada, verificada por

perda óssea radiográfica e perda de inserção clínica. A diminuição dos sinais inflamatórios, a maior prevalência e severidade da doença periodontal e a redução do sucesso da terapia periodontal nos pacientes fumantes representam um desafio à periodontia. Portanto, o estudo comparativo das características clínicas, radiográficas, morfométricas e imuno-histoquímicas de pacientes fumantes e não fumantes com saúde ou gengivite, pode contribuir para o entendimento dos efeitos do fumo sobre o periodonto e apontar alterações que permitam o estabelecimento do diagnóstico precoce.

2. CAPÍTULOS

2.1. A RELAÇÃO DO FUMO COM A PROFUNDIDADE DE SONDAGEM, DENSIDADE ÓTICA E POSIÇÃO DA CRISTA ÓSSEA ALVEOLAR RELATIONSHIP OF CIGARETTE SMOKING WITH PROBING DEPTH, OPTICAL DENSITY AND POSITION OF ALVEOLAR BONE CREST

Fernanda da Roz RODRIGUES*

Prof. Cristina Cunha VILLAR**

Prof. Dr. Antonio Fernando MARTORELLI DE LIMA***

UNITERMOS: densidade ótica, profundidade de sondagem, tabaco, fumo.

UNITERMS: optical density, probing deep, tobacco, smoking

RESUMO

Tem sido proposto que o hábito de fumar pode modificar os sinais clínicos inflamatórios, influir na profundidade de sondagem e no nível clínico de inserção, entretanto, os métodos clínicos e radiográficos convencionais disponíveis falham em encontrar diferenças sutis no nível e na densidade ótica da crista óssea alveolar. O objetivo deste trabalho foi investigar a relação do fumo com a profundidade de sondagem, densidade ótica e posição da crista óssea alveolar em pacientes jovens. Foram selecionados quatro grupos de pacientes (grupo I: não fumantes com saúde gengival, grupo II: não fumantes com gengivite, grupo III: fumantes com saúde gengival, grupo IV: fumantes com gengivite). Nesses voluntários foram considerados os índices de placa (IPI), de sangramento (SS) e supuração (SuS) à sondagem, os parâmetros clínico profundidade de sondagem

* Aluna de graduação, FOP/Unicamp

** Mestranda em Periodontia, Mestre em Estomatopatologia, FOP/Unicamp,

*** Professor Titular, Departamento de Prótese e Periodontia, Área de Periodontia, FOP/Unicamp.

(PS) e radiográficos densidade ótica (DO) e nível da crista óssea alveolar (NCOA) com o auxílio respectivamente de sonda periodontal computadorizada e imagem radiográfica digital. Os dados foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA), considerando significativo o valor de $\alpha=0.05$. Os resultados mostraram que não há diferença estatística significativa na densidade e no nível da crista óssea alveolar entre os grupos avaliados. A profundidade de sondagem foi maior nos dentes inferiores dos pacientes fumantes, principalmente naqueles com gengivite.

INTRODUÇÃO

O fumo é um fator de risco comprovado para várias doenças e existem evidências que sugerem sua influência na saúde bucal (HABER *et al.*¹³, 1993; PREBER e BERGSTRÖM²⁰, 1985) e no desenvolvimento e progressão da doença periodontal (HABER *et al.*¹³, 1993).

No passado, o fumo foi considerado como co-fator no desenvolvimento da doença periodontal, associando o hábito e o maior acúmulo do biofilme dental nos pacientes fumantes (PREBER *et al.*¹⁹, 1980). Entretanto, a relação direta entre o sangramento gengival e o tabagismo foi demonstrada em irmãos gêmeos por BERGSTRÖM e FLOREDUS-MYRHED² (1983), que concluíram que os sinais clínicos inflamatórios não eram tão evidentes nos indivíduos fumantes. Outros estudos confirmaram esses achados, sugerindo que a resposta inflamatória induzida a partir do acúmulo do biofilme dental seria modificada pelo fumo

(BERGSTRÖM e PREBER³, 1986; BERGSTRÖM *et al.*⁷, 1988; BERGSTRÖM *et al.*⁸, 1990; PREBER e BERGSTRÖM²⁰, 1985; RIVERA-HIDALGO²³, 1986). Portanto, independente do grau de higiene oral, os fumantes mostram redução dos sinais clínicos da gengivite (BERGSTRÖM *et al.*⁷, 1988; BERGSTRÖM *et al.*⁸, 1990; PREBER e BERGSTRÖM²⁰, 1985) e isso é causado pela alteração na resposta inflamatória vascular e celular induzida pelo fumo (BERGSTRÖM *et al.*⁷, 1988).

Além de modificar os sinais clínicos inflamatórios, o fumo tem sido associado à perda óssea alveolar, ao aumento da profundidade de sondagem e à perda no nível clínico de inserção (ARNO *et al.*¹, 1959; BERGSTRÖM e FLOREDUS-MYRHED², 1983; BERGSTRÖM e ELIASSON⁴, 1986; BERGSTRÖM e ELIASSON⁵, 1987; BERGSTRÖM *et al.*⁹, 1991; BOLIN *et al.*¹⁰, 1986; GROSSI *et al.*¹², 1994; HABER *et al.*¹³, 1993; PREBER e BERGSTRÖM²¹, 1986; STOLTENBERG *et al.*²⁶, 1993) sendo sugestiva a correlação positiva entre esses aspectos, o número de cigarros consumidos e a duração do tabagismo (MARTINEZ-CANUT *et al.*¹⁷, 1995).

O efeito do fumo sobre a crista óssea alveolar pode não estar acompanhado de sinais clínicos inflamatórios evidentes da gengivite (BERGSTRÖM e ELIASSON⁶, 1987). Os estudos de avaliação da profundidade de sondagem e do nível da crista óssea entre jovens fumantes e não fumantes falharam em encontrar diferenças entre esses pacientes (PREBER *et al.*¹⁹, 1980). Isso pode ser atribuído a dificuldade em se identificar alterações sutis com os métodos clínicos e radiográficos convencionais disponíveis (PREBER *et al.*¹⁹, 1980). Desta forma, o

objetivo deste trabalho foi investigar a relação do fumo e a profundidade de sondagem, densidade ótica e posição da crista óssea alveolar em pacientes jovens.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção da amostra

Foram selecionados 40 pacientes adultos jovens (20 a 35 anos de idade), com características clínicas de saúde gengival (índice gengival grau 0 de Loe & Silness, 1964) ou de gengivite (índice gengival grau II de Loe & Silness, 1964). Destes pacientes, 20 eram não fumantes e 20 fumantes (Tabela 1). Foram considerados fumantes os indivíduos que consumiam 10 ou mais cigarros por dia (MARTINEZ-CANUT *et al.*¹⁷, 1995).

Foram excluídos da amostra os pacientes ex-fumantes, com bolsa periodontal ou perda óssea identificadas nos exames clínico e radiográfico, gestantes, indivíduos com alterações sistêmicas ou anormalidades imunológicas detectadas em exames físicos e laboratoriais, ou que fizeram uso de qualquer droga nas 4 semanas que antecederam o experimento.

Os pacientes foram divididos em 4 grupos, de acordo com as características clínicas e o hábito de tabagismo para compor os grupos I: não fumante com gengiva clinicamente saudável (n=10), II: não fumante com gengivite (n=10), III: fumante com gengiva clinicamente saudável (n=10) e IV: fumante com gengivite (n=10).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS de 10/10/96, sob protocolo nº 081/2001 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento formal e esclarecido.

Exame Clínico

O exame clínico incluiu a avaliação dicotômica dos índices de placa (IPI), de sangramento (SS) e supuração (SuS) à sondagem e do parâmetro profundidade de sondagem (PS). As variáveis foram analisadas em seis sítios específicos (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual) nos dentes de Ramfjord (11, 16, 24, 31, 36 e 44) (GETTINGER *et al.*¹¹, 1983). As medidas clínicas foram padronizadas e obtidas com o auxílio de sonda periodontal eletrônica de pressão controlada do Sistema Florida Probe^{®*}.

Os valores de profundidade de sondagem em cada sítio específico nos dentes de Ramfjord permitiram a determinação de valores médios de profundidade de sondagem para quatro faces (mesial, distal, vestibular e lingual) em cada dente avaliado. A média dos valores verificados nos sítios mésio-vestibular e mésio-lingual e nos sítios disto-vestibular e disto lingual permitiram o cálculo dos valores das faces mesial e distal. A partir de valores individuais calculou-se os valores de cada grupo. Todos os voluntários do estudo foram avaliados pelo mesmo pesquisador.

* Florida Probe, Gainesville, FL, USA.

Exame Radiográfico

O exame radiográfico digital intra-bucal foi realizado para avaliar a densidade ótica e o nível da crista óssea alveolar. Os sítios foram radiografados pela técnica do paralelismo com o sensor radiográfico do sistema radiográfico digital Acu-Ray[®] posicionado paralelo ao longo eixo do dente. A densidade ótica da crista óssea alveolar foi avaliada na face mesial dos dentes de Ramfjord com auxílio de programa computadorizado Imagelab[®]. Em cada imagem digital a área de analisada correspondeu a um triângulo equilátero de 1 mm de base, com um dos vértices coincidente com o ponto mais coronal da crista óssea alveolar (Figura 1). Distâncias interdentais na altura da JCE menores que 1.0 mm foram descartadas. A densidade ótica foi expressa pela média de cada grupo de dentes (incisivos, pré-molares e molares - superiores e inferiores) considerando os grupos de estudo.

O nível da crista óssea alveolar foi medido na face mesial dos dentes de Ramfjord e definido como a sendo a distância entre 2 retas paralelas, a primeira posicionada na altura da junção cimento esmalte e a segunda no ponto mais coronal da crista óssea alveolar adjacente (Figura 2). A média das distâncias foi calculada para cada grupo de dentes (incisivos, pré-molares e molares - superiores e inferiores) considerando os grupos de estudo.

[®] New Image do Brasil. Imp. Exp. Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

[®] Imagelab, São Paulo, SP, Brasil.

As radiografias foram avaliadas por um único examinador que não teve acesso às informações relativas ao estado de saúde e hábito de tabagismo do voluntário.

Análise Estatística

Os resultados da profundidade de sondagem, do nível da crista óssea alveolar e da densidade ótica foram expressos em média \pm desvio padrão considerando os quatro grupos. Para análise da diferença entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) presumindo variáveis independentes e utilizando o nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

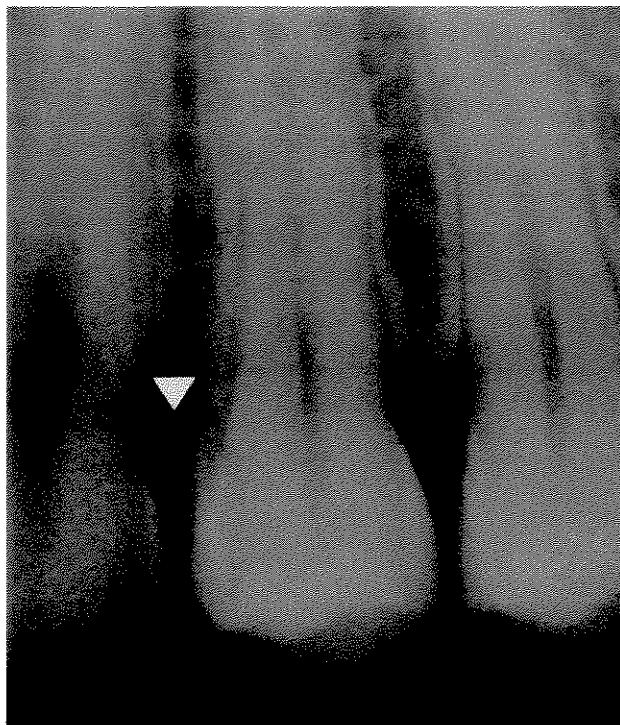


Figura 1: Área selecionada para análise da densidade ótica da crista óssea alveolar.

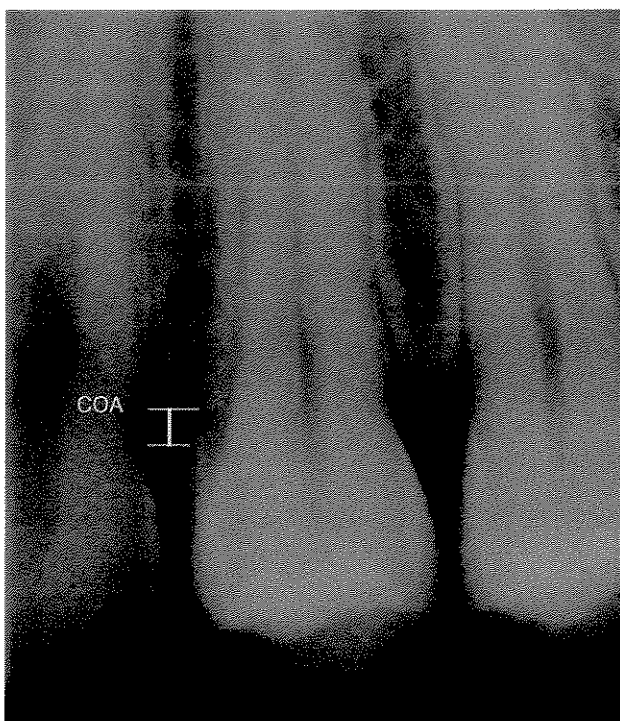


Figura 2: Traçado do nível da crista óssea alveolar. JCE = junção cimento esmalte, COA = crista óssea alveolar.

RESULTADOS

As tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 comparam a média e o desvio padrão da profundidade de sondagem nas quatro faces avaliadas dos dentes de Ramfjord em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G).

A tabela 9 compara a média e o desvio padrão do nível da crista óssea alveolar mesial dos dentes de Ramfjord em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G).

A tabela 10 compara a média e o desvio padrão da densidade ótica da crista óssea alveolar mesial dos dentes de Ramfjord em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G).

Tabela 1. Informações clínicas correspondentes aos pacientes.(M = masculino, F = feminino)

Grupo	Paciente	Idade	Gênero
I	1	25	F
	2	23	F
	3	32	M
	4	26	F
	5	22	F
	6	20	M
	7	26	F
	8	29	F
	9	20	M
	10	21	F
II	1	22	F
	2	20	F
	3	32	F
	4	35	F
	5	24	M
	6	29	M
	7	21	F
	8	24	M
	9	30	M
	10	22	F
III	1	35	M
	2	27	F
	3	32	M
	4	28	F
	5	21	F
	6	20	M
	7	20	M
	8	23	F
	9	24	F
	10	27	M
IV	1	30	M
	2	21	M
	3	35	F
	4	34	F
	5	22	F
	6	28	F
	7	22	F
	8	25	F
	9	23	F
	10	23	M

I = não fumantes / saúde gengival, II = não fumantes / gengivite, III = fumantes / saúde gengival, IV = fumantes / gengivite.

Tabela 2: Características referentes ao hábito e consumo de cigarros.

Característica	Hábito		
Grupo	III (n=5)	IV (n=5)	
Consumo Diário	15 ± 6,21	14 ± 3,04	(p=0,59)
Duração do Hábito	10,41 ± 3,23	8,7 ± 1,56	(p=0,34)
Exposição Total	156 ± 73,72	127 ± 53,57	(p=0,18)

III = fumantes com saúde gengival, IV = fumantes com gengivite. Teste t de Student (p<0,05).

Tabela 3: Média e desvio padrão da profundidade de sondagem do incisivo central superior direito (11) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em mm.

Dente 11 Face	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=10)	F-G (n=10)
m	1,61 ± 0,27 ab	1,90 ± 0,47 ab	1,63 ± 0,38 b	2,05 ± 0,43 a
d	1,68 ± 0,29 ab	1,84 ± 0,46 ab	1,59 ± 0,27 b	2,08 ± 0,46 a
v	1,70 ± 1,03 a	1,68 ± 0,44 a	1,64 ± 0,36 a	1,88 ± 0,58 a
l	1,46 ± 0,37 a	1,58 ± 0,46 a	1,66 ± 0,28 a	1,56 ± 0,88 a

m = mesial, d = distal, v = vestibular, l = lingual.

ANOVA (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

Tabela 4: Média e desvio padrão da profundidade de sondagem do primeiro molar superior direito (16) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em mm.

Dente 16 Face	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=10)	F-G (n=10)
m	1,73 ± 0,45 a	1,86 ± 0,29 a	1,72 ± 0,36 a	1,86 ± 0,60 a
d	1,63 ± 0,57 a	1,69 ± 0,41 a	1,41 ± 0,53 a	1,77 ± 0,48 a
v	1,28 ± 0,60 a	1,52 ± 0,38 a	1,46 ± 0,27 a	1,42 ± 0,38 a
l	1,06 ± 0,34 a	1,34 ± 0,46 a	1,26 ± 0,53 a	1,34 ± 0,57 a

m = mesial, d = distal, v = vestibular, l = lingual.

ANOVA (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

Tabela 5: Média e desvio padrão da profundidade de sondagem do primeiro pré-molar superior esquerdo (24) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em mm.

Dente 24 Face	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=10)	F-G (n=10)
m	1,54 ± 0,45 a	1,81 ± 0,56 a	1,48 ± 0,30 a	1,95 ± 0,35 a
d	1,89 ± 0,36 a	2,11 ± 0,61 a	1,87 ± 0,38 a	2,19 ± 0,43 a
v	1,26 ± 0,56 a	1,50 ± 0,46 a	1,20 ± 0,41 a	1,38 ± 0,48 a
l	1,50 ± 0,51 a	1,48 ± 0,27 a	1,34 ± 0,52 a	1,68 ± 0,75 a

m = mesial, d = distal, v = vestibular, l = lingual.

ANOVA (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

Tabela 6: Média e desvio padrão da profundidade de sondagem do incisivo central inferior esquerdo (31) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em mm.

Dente 31 Face	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=10)	F-G (n=10)
M	1,71 ± 0,38 a	1,67 ± 0,54 a	1,70 ± 0,28 a	2,11 ± 0,51 a
d	2,08 ± 0,41 a	2,21 ± 0,27 a	2,09 ± 0,42 a	2,19 ± 0,52 a
V	1,22 ± 0,55 ab	1,40 ± 0,40 a	0,90 ± 0,37 b	1,76 ± 0,49 a
L	1,20 ± 0,63 a	1,62 ± 0,68 a	1,34 ± 0,46 a	1,84 ± 0,84 a

m = mesial, d = distal, v = vestibular, l = lingual.

ANOVA (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 7: Média e desvio padrão da profundidade de sondagem do primeiro molar inferior esquerdo (36) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em mm.

Dente 36 Face	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=10)	F-G (n=10)
m	1,58 ± 0,38 b	1,53 ± 0,52 b	1,61 ± 0,37 b	2,17 ± 0,47 a
d	1,90 ± 0,51 b	1,79 ± 0,55 b	1,83 ± 0,54 b	2,70 ± 0,64 a
v	1,38 ± 0,35 a	1,22 ± 0,48 a	1,60 ± 0,37 a	1,60 ± 0,80 a
l	1,64 ± 0,76 a	1,52 ± 0,58 a	1,66 ± 0,65 a	1,70 ± 0,58 a

m = mesial, d = distal, v = vestibular, l = lingual.

ANOVA (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 8: Média e desvio padrão da profundidade de sondagem do primeiro pré-molar inferior direito (44) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em mm.

Dente 44 Face	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=10)	F-G (n=10)
m	1,88 ± 0,64 a	2,01 ± 0,58 a	1,66 ± 0,43 a	2,26 ± 0,34 a
d	1,46 ± 0,32 ab	1,36 ± 0,52 b	1,51 ± 0,33 ab	1,87 ± 0,45 a
v	1,22 ± 0,30 a	1,26 ± 0,60 a	1,22 ± 0,38 a	1,34 ± 0,31 a
l	1,52 ± 0,43 ab	1,26 ± 0,43 b	1,52 ± 0,46 ab	1,88 ± 0,41 a

m = mesial, d = distal, v = vestibular, l = lingual.

ANOVA ($p < 0,05$). Na linha, médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 9: Média e desvio padrão da densidade ótica da crista óssea alveolar em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em pixel. Face mesial.

Sítio	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=10)	F-G (n=10)
11	95,32 ± 18,66 a	93,67 ± 17,43 a	82,04 ± 24,05 a	86,56 ± 28,18 a
16	86,20 ± 22,51 a	89,76 ± 21,01 a	80,24 ± 16,85 a	83,64 ± 16,00 a
24	85,65 ± 13,82 a	84,27 ± 20,09 a	93,49 ± 24,70 a	82,63 ± 22,91 a
31	67,57 ± 34,03 a	63,80 ± 25,16 a	61,84 ± 35,58 a	68,71 ± 18,15 a
36	82,03 ± 8,64 a	69,00 ± 21,10 a	56,14 ± 15,69 a	51,89 ± 15,36 a
44	66,11 ± 14,61 a	71,21 ± 20,11 a	65,11 ± 18,39 a	64,00 ± 19,29 a

ANOVA ($p < 0,05$). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

Tabela 10: Média e desvio padrão do nível da crista óssea alveolar em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em mm. Face mesial.

Sítio	Grupos			
	NF-S (n=10)	NF-G (n=10)	F-S (n=7)	F-G (n=7)
11	1,20 ± 0,35 a	1,21 ± 0,34 a	1,63 ± 0,51 a	1,67 ± 0,89 a
16	1,16 ± 0,40 a	1,17 ± 0,40 a	0,99 ± 0,39 a	1,28 ± 0,45 a
24	1,17 ± 0,46 a	1,18 ± 0,27 a	1,26 ± 0,73 a	1,28 ± 0,29 a
31	1,66 ± 0,45 a	1,85 ± 0,20 a	1,67 ± 0,52 a	1,68 ± 0,37 a
36	1,28 ± 0,21 a	1,47 ± 0,22 a	1,43 ± 0,35 a	1,23 ± 0,55 a
44	1,60 ± 0,42 a	1,60 ± 0,40 a	1,83 ± 0,64 a	1,82 ± 0,75 a

ANOVA ($p < 0,05$). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

DISCUSSÃO

Tem sido proposto que o hábito de fumar pode modificar os sinais clínicos e influir na profundidade de sondagem, no nível clínico de inserção e na perda óssea em

pacientes adultos fumantes com doença periodontal destrutiva instalada (ARNO *et al.*¹, 1959; BERGSTRÖM e FLOREDUS-MYRHED², 1983; BERGSTRÖM e ELIASSON⁵, 1987; BERGSTRÖM *et al.*⁹, 1991; BOLIN *et al.*¹⁰, 1986; GROSSI *et al.*¹², 1994; HABER *et al.*¹³, 1993; PREBER e BERGSTRÖM²¹, 1986; STOLTENBERG *et al.*²⁶, 1993).

A diminuição dos sinais clínicos e de sinais radiográficos evidentes, correspondentes a reabsorção da crista óssea alveolar, nos fumantes pode mascarar a presença da doença periodontal (BERGSTRÖM e ELIASSON⁶, 1987).

Em nosso estudo, não encontramos diferença estatística significativa no nível da crista óssea alveolar entre os grupos avaliados (Tabela 10). Nossos resultados estão em acordo com a literatura disponível que mostra a posição da crista óssea alveolar entre 1 e 2 mm apical à junção cimento esmalte na saúde periodontal ou na gengivite (HAUSMANM¹⁵, 1997). Embora não tenha sido apontada diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, os indivíduos fumantes, independente do estado de saúde, apresentaram valores numéricos superiores aos indivíduos não fumantes.

Nossos resultados também mostraram que não há diferença estatística significativa na densidade ótica da crista óssea alveolar entre os grupos (Tabela 9), ainda que nos pacientes fumantes com gengivite tenham sido encontrados valores de densidade ótica menor. Estes resultados não estão de acordo com ROMANELLI *et al.*²⁴ (1998), que trabalharam com metodologia diferente da nossa e encontraram diminuição na densidade ótica dos pacientes com gengivite em comparação aos pacientes com saúde periodontal.

Em nosso estudo, a densidade ótica foi avaliada com o auxílio de um software, em uma área definida da imagem digital, enquanto que ROMANELLI *et al.*²⁴ (1998) utilizaram um fotodensitômetro para avaliar a densidade ótica em dois pontos. Segundo os critérios de inclusão, parte de nossa amostra foi composta por pacientes com gengivite grau II de Løe & Silness, enquanto que no estudo de ROMANELLI *et al.*²⁴ (1998) foram selecionados voluntários com inflamação gengival severa, grau III de Løe & Silness, o que pode ter favorecido a identificação da diferença entre os grupos.

O efeito do cigarro na densidade ótica do tecido ósseo alveolar em pacientes fumantes com saúde gengival ou gengivite representa um estudo inédito. SPARROW *et al.*²⁵ (1982) avaliaram a densitometria mineral dos ossos do carpo em voluntários fumantes e verificaram perda de substância mineral, efeito atribuído a provável ação sistêmica do fumo. Em nosso estudo, a ausência do efeito do fumo na densidade ótica pode ser explicada pela idade reduzida dos pacientes que apresentaram no máximo 35 anos, pelo período de exposição ao fumo e pelas diferenças de metodologia. Enquanto avaliamos a densidade ótica da crista óssea alveolar, SPARROW *et al.*²⁵ (1982) utilizaram a densitometria óssea. A densidade ótica usada em nosso estudo, parece ser um método limitado para evidenciar alterações sutis.

Nossos resultados sugeriram maior profundidade de sondagem nos dentes mandibulares dos pacientes fumantes, em particular naqueles com sinais clínicos inflamatórios de gengivite (Tabelas 7 e 8). O aumento da profundidade de sondagem nos indivíduos fumantes pode estar relacionado com alterações

morfológicas e funcionais dos fibroblastos, que expostos à ação da nicotina desenvolvem receptores de superfície que permitem a ligação e internalização desta substância no seu citoplasma (HANES *et al.*¹⁴, 1991). RAULIN *et al.*²² (1988) verificaram redução na proliferação, migração e adesão dos fibroblastos sobre superfícies radiculares expostas à nicotina. Essas alterações provocam prejuízo no metabolismo celular, representado pela redução na secreção de proteínas e na síntese de fibras colágenas, e a redução da síntese das fibras colágenas prejudica o turn over tecidual (MECKLENBURG e GROSSI¹⁸, 2000).

Na presença de processo inflamatório, metaloproteinases matriciais degradam as fibras colágenas do tecido conjuntivo (KINANE e LINDHE¹⁶, 1999) e nesta condição a presença de fibroblastos alterados pela nicotina pode ser mais relevante, pois compromete a renovação e substituição das fibras. Nossos resultados clínicos ilustram essa situação, conforme observado nas tabelas 7 e 8, que sugerem maior profundidade de sondagem no grupo de pacientes fumantes com gengivite.

CONCLUSÃO

Não houve diferença estatística significativa na densidade ótica e no nível da crista óssea alveolar entre os grupos avaliados. A profundidade de sondagem foi maior nos dentes inferiores dos pacientes fumantes, principalmente naqueles com gengivite, o que pode indicar o início dos efeitos citotóxicos do fumo no periodonto.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pela colaboração na análise estatística.

ABSTRACT

It has been proposed that smoking can modify inflammatory clinical signs and influence both the probing depth and the clinical attachment level. However, conventional methods fail in finding differences in the position and optical density of the alveolar bone crest. The aim of this study was to investigate the correlation of cigarette smoking with the probing depth, optical density and position of the alveolar bone crest in young adults. Subjects were divided into 4 groups (group I: non-smoker with clinically healthy gingiva; Group II: non-smoker with gingivitis; Group III: smoker with clinically healthy gingiva; Group IV: smoker with gingivitis). In each volunteer, plaque index, bleeding (BOP) and suppuration on probing (SOP) and the clinical parameter of probing depth were evaluated using an pressure controled electronic periodontal probe. Radiographic findings of the density and position of the alveolar bone crest were evaluated by using radiographic digital images. Statistic analysis was carried out by using ANOVA at a significance level of $\alpha=0.05$. No statistically significant differences were observed in relation to the optical density and position of the alveolar bone crest among the groups. The probing depth was deeper for inferior teeth of smokers, especially for those presenting gingivitis. The deeper probing depth in smokers can be interpreted as loss of the clinical attachment level.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARNO, A. *et al.* Alveolar bone loss as a function of tobacco consumption. *Acta Odontol Scand*, v.17, p. 3-9. 1959.
2. BERGSTRÖM, J.; FLODERUS-MYRHED, B. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol*, v.11, p. 113-116. 1983.
3. BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodontal Res*, v.21, p. 668-676. 1986.
4. BERGSTÖM, J.; ELIASSON, S. Alveolar bone height in professional musicians. *Acta Odontol Scand*, v.44, p. 141-147. 1986.
5. BERGSTRÖM, J.; ELIASSON, S. Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standart of oral hygiene. *J Clin Periodontol*, v.14, p. 466-469. 1987.
6. BERGSTRÖM, J.; ELIASSON, S. Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontal Res*, v.22, p. 513- 517. 1987.
7. BERGSTRÖM, J. *et al.* Influence of cigarette smoking on vascular reaction during experimental gingivitis. *Scand J Dent Res*, v.96, p. 34-39. 1988.
8. BERGSTRÖM, J. Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smoking. *Scand J Dent Res*, v.98, p. 497-503. 1990.
9. BERGSTRÖM, J.; ELIASSON, S.; PREBER, H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol*, v.62, p. 242-246. 1991.

10. BOLIN, A. *et al.* Proximal alveolar bone loss in a longitudinal radiographic investigation. IV. Smoking and some other factors influencing the progress in individuals with at least 20 remaining teeth. *Acta Odontol Scand*, v.44, p. 263-269. 1986.
11. GETTINGER, G. *et al.* The use of six selected teeth in population measures of periodontal status. *J Periodontol*, v.54, p. 155- 159. 1983.
12. GROSSI, S.G. *et al.* Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*, v.65, p. 260-267. 1994.
13. HABER, J. *et al.* Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol*, v.64, p. 16-23. 1993.
14. HANES, P. J.; SCHUSTER G. S.; LUBAS, S. Binding uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol*, v.62, p.142-147. 1991.
15. HAUSMANM, E. *Peridontia Contenporanea*. Genco, R. J.; Goldman, H. M.; Cohen, D. W. 2 ed. São Paulo: Santos, 1997. Cap. 25. p. 333-334.
16. KINANE E LINDHE, *Tratado de Periodontia e Implantodontia Oral*, 1999 Guanabara Koogan, 3 ed. Rio de Janeiro.
17. MARTINEZ-CANUT, P.; LORCA, A.; MAGÁN, R. Smoking and periodontal disease severity. *J Clin Periodontol*, v.22, p. 743-749. 1995.
18. MECKLENBURG, R. E.; GROSSI, S. G. *Periodontal Medicine*, 2000. Rose, L. F. Tobacco use and intervention. Chapter 7, p. 99-119.

19. PREBER, H.; KANT, T.; BERGSTROM, J. Cigarette smoking, oral hygiene and periodontal health in Swedish army conscripts. *J Clin Periodontol*, v.7, p. 106-113. 1980.
20. PREBER, H.; BERGSTRÖM, J. Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients. *Acta Odontol Scand*, v.43, p. 315-320. 1985.
21. PREBER, H.; BERGSTRÖM, J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scand J Dent Res*, v.94, p. 102-108. 1986.
22. RAULIN, L. A. *et al.* The effect of nicotine on the attachment of humans fibroblasts to glass and human root surface in vitro. *J Periodontol*, v.59, p. 318-325. 1988.
23. RIVERA-HIDALGO, F. Smoking and periodontal Disease- A review of the literature. *J Periodontol*, v.57, p. 617-424. 1986.
24. ROMANELLI, R. G. *et al.* Avaliação da densidade radiográfica da crista óssea alveolar em pacientes com gengivite. *Revista Periodontia*, v.7, p. 123-126. 1998.
25. SPARROW, D. *et al.* The influence of cigarette smoking and age on bone loss in men. *Arch Environ Health*, v.37, p. 246-449. 1982.
26. STOLTENBERG, J. L. *et al.* Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontol status. *J Periodontol*, v.64, p. 1225-1230. 1993.

2.2 A INFLUÊNCIA DO FUMO NA ESPESSURA EPITELIAL DA GENGIVA MARGINAL.

THE SMOKE INFLUENCE ON MARGINAL GINGIVAL EPITHELIAL THICKNESS.

Prof. Cristina Cunha VILLAR*, Prof. Dr. Antonio Fernando MARTORELLI DE LIMA**

VILLAR, C. C.; LIMA, A. F. M. A influência do fumo na espessura epitelial da gengiva marginal.

Rev Odontol Univ São Paulo

RESUMO

Pacientes fumantes freqüentemente apresentam redução dos sinais clínicos inflamatórios da gengivite associada, em grande parte, a vasoconstrição local e aumento da espessura epitelial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a espessura do epitélio oral da gengiva marginal de pacientes fumantes e não fumantes, nos estados de saúde gengival e gengivite. Foram obtidos vinte fragmentos de tecido gengival de quatro grupos de pacientes. Grupo I: não fumantes com saúde gengival (n=5), Grupo II: não fumantes com gengivite (n=5), Grupo III: fumantes com saúde gengival (n=5), Grupo IV: fumantes com gengivite (n=5). As biópsias receberam processamento histológico de rotina e coração H&E. Com auxílio de sistema de imagens KS400 foram quantificadas a espessura epitelial maior e a espessura da base epitelial, e determinados os valores dos perímetros da superfícies externa e interna do epitélio. Os dados foram avaliados pelo Teste de Tukey considerando significativo o valor de $\alpha=0.05$. Os resultados mostraram

*Mestranda em Periodontia, mestre em Estomatopatologia, FOP/Unicamp

**Professor Titular, Departamento de Prótese e Periodontia, Área de Periodontia, FOP/Unicamp

valores da espessura da base epitelial maior ($p < 0.05$) nos pacientes fumantes, independente do estado de saúde gengival.

UNITERMOS: Gengiva, espessura epitelial, tabaco.

INTRODUÇÃO

A associação entre o fumo e a saúde periodontal tem sido descrita em estudos clínicos e epidemiológicos ^{1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 13}, que sugerem que os produtos derivados da combustão do tabaco são capazes de modificar as características clínicas e a progressão da doença periodontal. Desde então, o fumo tem sido descrito como fator de risco à doença periodontal ^{7, 9, 12}.

PREBER, KANT E BERGSTRÖM ¹² (1980) afirmaram que os pacientes fumantes exibiam sinais inflamatórios de maior intensidade que os não fumantes, relacionando esse achado com o menor controle e o maior acúmulo do biofilme dental nos fumantes. Em 1983, BERGSTRÖM & FLODERUS-MYRHED ¹ verificaram redução do sangramento gengival nos pacientes fumantes com alto consumo de tabaco. A partir desse estudo, outros trabalhos confirmaram a redução dos sinais clínicos da gengivite nos pacientes fumantes, sugerindo que a resposta inflamatória seria modificada pelo fumo ^{2, 3, 5, 7}.

BERGSTRÖM & PREBER ² (1986) utilizaram o modelo experimental de gengivite em pacientes fumantes e não fumantes e verificaram que embora a taxa de formação de placa fosse semelhante entre os grupos, os fumantes desenvolviam sinais clínicos inflamatórios menos pronunciados. A redução dos

sinais inflamatórios experimentada pelos pacientes fumantes em relação aos não fumantes ^{1, 2, 3, 4, 7} pode ser confirmada pela diminuição do sangramento à sondagem ^{2, 3, 4, 7}, pela redução da supuração, edema e vermelhidão tecidual ^{2, 3, 4} e redução do número de vasos sangüíneos da gengiva marginal ².

A redução dos sinais clínicos inflamatórios nos pacientes fumantes, particularmente quanto à coloração gengival e sangramento à sondagem, pode ser atribuída a vasoconstrição periférica causada especialmente pela cotinina ³. Adicionalmente às alterações vasculares, o aumento da espessura epitelial induzido pelo aumento da temperatura local provocado pela combustão do cigarro, também pode contribuir para a redução dos sinais inflamatórios nos pacientes fumantes. Embora a literatura aponte o aumento da espessura epitelial na mucosa bucal dos pacientes fumantes ⁶, não existem estudos morfométricos referentes à espessura epitelial no tecido gengival destes pacientes. O objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre a espessura epitelial da gengiva clinicamente saudável ou na presença da inflamação gengival e o hábito de fumo.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção do material

Foram selecionados 20 pacientes adultos jovens (20 a 35 anos de idade), com características clínicas de saúde (índice gengival grau 0 de Løe & Silness, 1963) ou gengivite (índice gengival grau II de Løe & Silness, 1963) e indicação de terapia periodontal cirúrgica com finalidade protética. Destes pacientes, 10 eram não

fumantes e 10 fumantes (Tabela 1). Foram considerados fumantes os indivíduos que utilizassem 10 ou mais cigarros por dia, por um período mínimo de 5 anos.

Foram excluídos da amostra pacientes ex-fumantes, com presença de bolsa periodontal ou perda óssea identificadas respectivamente com o auxílio de sonda periodontal eletrônica de pressão controlada do Sistema Florida Probe^{®*} e exame de imagem digitalizada do sistema radiográfico Acu-Ray^{®"}. Da mesma forma, pacientes gestantes, indivíduos com alterações sistêmicas ou anormalidades imunológicas detectadas em exames físicos e laboratoriais, ou que fizeram uso de qualquer droga nas últimas 4 semanas foram excluídos do estudo.

A biópsia foi executada durante a execução de procedimento de tratamento previamente planejado e permitiu a obtenção das amostras do tecido gengival marginal, com dimensões mínimas de 4,0 mm por 2,0 mm. A anti-sepsia intrabucal foi realizada com bochecho de digluconato de clorexidina a 0,2% por 1 minuto, a extra-bucal com iodo-povidine e a técnica anestésica transcorreu segundo a localização do sítio cirúrgico. As biópsias foram obtidas de diferentes regiões da cavidade bucal ² e divididas em 4 grupos, de acordo com as características clínicas e o hábito do tabagismo do doador. Grupo I: não fumante com gengiva clinicamente saudável (n=5); Grupo II: não fumante com gengivite (n=5); Grupo III: fumante com gengiva clinicamente saudável (n=5); Grupo IV: fumante com gengivite (n=5).

* Florida Probe, Gainesville, FL, USA.

" New Image do Brasil. Imp. Exp. Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS de 10/10/96, sob protocolo nº 076/2001 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento formal e esclarecido.

Análise morfométrica

Os fragmentos biopsiados foram fixados em formol a 10% e processados após 24 horas. Os cortes de parafina de 5µm foram corados em H&E e analisados considerando o epitélio gengival em sua porção oral, em 3 campos diferentes em aumento de 10x. Uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio permitiu a análise morfométrica computadorizada da espessura epitelial pelo sistema de de imagem Kontron S 400[®]. Durante a análise, o examinador não teve acesso as informações sobre o estado de saúde e o hábito de tabagismo do paciente.

Foram avaliados os perímetros superfície externa (PSE) e superfície interna do epitélio (PSI), espessura epitelial maior (EEM = distância entre a superfície externa do epitélio e a ponta da crista epitelial) e a espessura da base epitelial (EBE = distância entre a superfície do epitélio e a membrana basal localizada entre duas projeções epiteliais) (Figuras 1 e 2). Os perímetros foram avaliados em duplicata em 3 campos diferentes e as espessuras foram avaliadas em 3 campos por corte em 5 regiões totalizando 15 medidas, que foram transformadas em média aritmética e forneceram o valor da variável por lâmina. O valor final de cada lâmina foi expresso pela média dos campos examinados.

Análise Estatística

Os resultados morfométricos foram expressos em média \pm desvio padrão para os quatro grupos. Os dados mostraram homogeneidade e a diferença entre os grupos foi determinada por Análise de Variância (ANOVA - Teste de Tukey) considerando o nível de 5% de significância. Para análise da diferença do consumo de cigarros entre os grupos III e IV foi utilizado o Teste t de Student ($p < 0,05$).

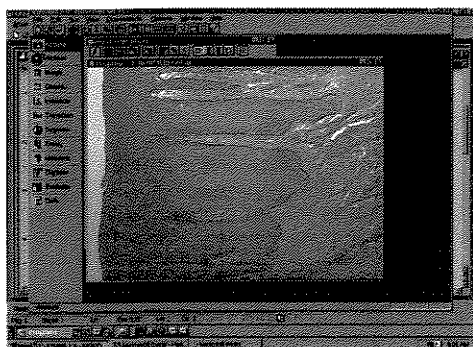


Figura 1: Traçados do perímetro da superfície externa (PSE) e perímetro da superfície interna (PSI) (H&E-10x).

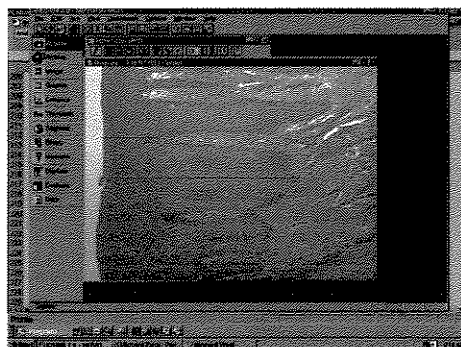


Figura 2: Traçados da espessura da base epitelial (EBE) e da espessura epitelial maior (EEM) (H&E-10x).

RESULTADOS

Os pacientes fumantes clinicamente saudáveis (grupo III) consumiam em média $17 \pm 8,37$ cigarros/dia durante $9,8 \pm 3,49$ anos, e os fumantes com gengivite (grupo IV) $15 \pm 3,54$ cigarros/dia, por $8,8 \pm 2,39$ anos, sem diferença estatística significativa entre os grupos. Não houve diferença estatística significativa ($p=0,15$) entre fumantes clinicamente saudáveis (grupo III) e fumantes com gengivite (grupo IV), que consumiram respectivamente $173 \pm 83,72$ e $146 \pm 55,50$ cigarros,

* Kontron Elektronik, München, Germany

considerando o número de cigarros consumidos por dia X a duração do hábito em anos (Tabela 2).

O epitélio gengival marginal apresentou-se escamoso estratificado com queratinizado com pequenos espaços intercelulares. O estrato espinhoso ocupava cerca de 50% da espessura total do epitélio e o estrato córneo foi mais exuberante nas amostras obtidas de pacientes fumantes (Figura 3). Em algumas amostras de pacientes com gengivite (grupos II e IV) notou-se a presença de glicogênio nos queratinócitos (Figura 4).

Não houve diferença estatística significativa na espessura epitelial maior entre pacientes fumantes e não fumantes, independente da condição clínica, entretanto, a espessura da base epitelial foi maior nos indivíduos fumantes em relação aos não fumantes ($p < 0,05$) (Tabelas 3 e 4).

Não houve diferença estatística significativa nos valores médios dos perímetros da superfície epitelial externa e interna de voluntários fumantes e não fumantes, independente da condição clínica gengival (Tabelas 5 e 6).

Tabela 1. Informações clínicas correspondentes aos pacientes.

Grupo	Paciente	Idade	Gênero	Localização
I	1	32	M	13 palatina
	2	23	F	36 vestibular
	3	26	F	26 palatina
	4	22	F	26 palatina
	5	26	F	25 palatina
II	1	29	M	25 palatina
	2	22	F	14 palatina
	3	20	F	37 lingual
	4	32	F	26 palatina
	5	35	F	26 palatina
III	1	35	M	44 vestibular
	2	28	F	16 palatina
	3	27	M	25 palatina
	4	32	M	26 palatina
	5	21	F	16 palatina
IV	1	30	M	25 palatina
	2	35	F	25 palatina
	3	34	F	46 lingual
	4	22	F	16 palatina
	5	28	F	17 palatina

M = masculino, F = feminino, I = pacientes não fumantes com saúde gengival, II = pacientes não fumantes com gengivite, III = pacientes fumantes com saúde gengival, IV = pacientes fumantes com gengivite.

Tabela 2: Características referentes ao hábito e consumo de cigarros.

Característica	Hábito		
	III (n=5)	IV (n=5)	
Grupo			
Consumo Diário	17 ± 8,37	15 ± 3,54	(p=0,59)
Duração do Hábito	9,8 ± 3,49	8,8 ± 2,39	(p=0,27)
Exposição Total	173 ± 83,72	146 ± 55,50	(p=0,15)

III = pacientes fumantes com saúde gengival, IV = pacientes fumantes com gengivite.

Teste t de Student - considerando o nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

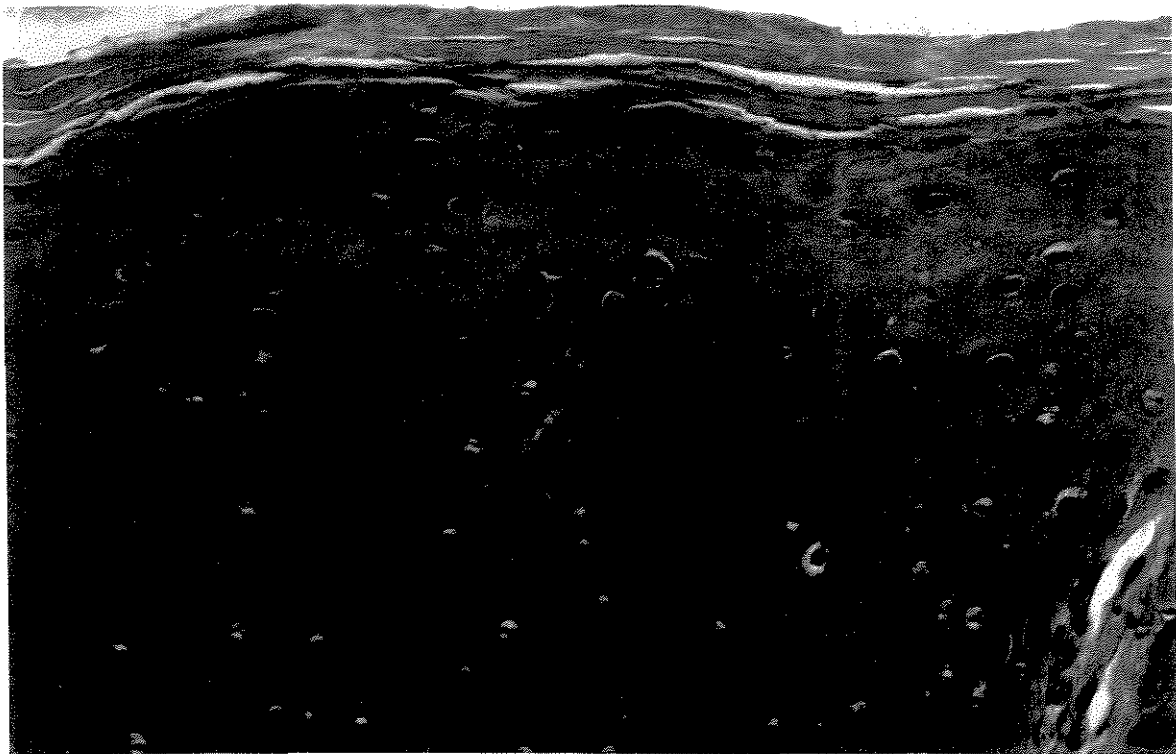


Figura 3: Nota-se a presença de extrato córneo exuberante no epitélio oral da gengiva marginal de indivíduo fumante (H&E-40x).

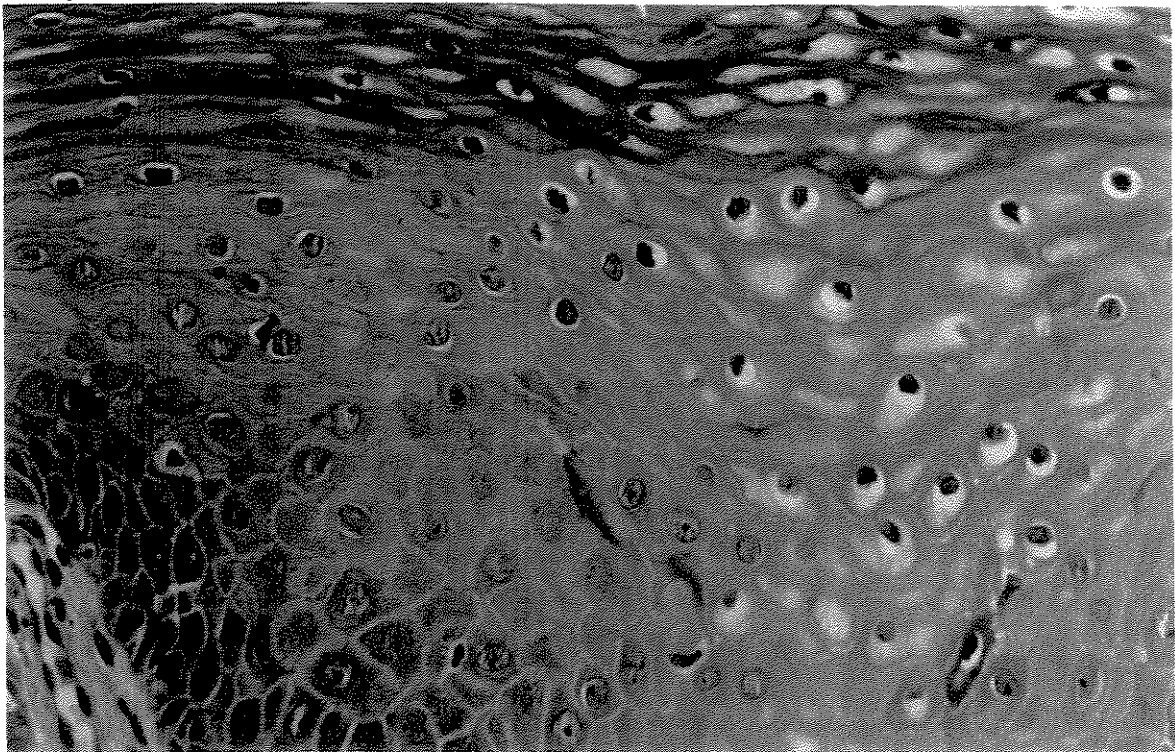


Figura 4: Nota-se distúrbio do processo de queratinização e presença de acúmulo citoplasmático sugestivo de glicogênio no epitélio do sulco da gengiva marginal de sítio com sinais clínicos de inflamação em paciente não fumante (H&E-40x).

Tabela 3: Média e desvio padrão da espessura epitelial maior (EEM) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em μm .

Condição clínica	Hábito	
	NF (n = 10)	F (n = 10)
G (n = 10)	434,77 \pm 53,84 Aa	506,05 \pm 84,61 Aa
S (n = 10)	460,86 \pm 38,26 Aa	534,38 \pm 54,61 Aa

ANOVA ($p < 0,05$). Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si.

Na coluna, médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si.

Tabela 4: Média e desvio padrão da espessura da base epitelial (EBE) em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), nos estados de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em μm .

Condição clínica	Hábito	
	NF (n = 10)	F (n = 10)
S (n = 10)	250,91 \pm 37,58 Ba	259,88 \pm 59,22 Aa
G (n = 10)	174,86 \pm 59,22 Ba	274,68 \pm 47,26 Aa

ANOVA ($p < 0,05$). Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si.

Na coluna, médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si.

Tabela 5: Média e desvio padrão do perímetro da superfície externa (PSE) do epitélio em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), portadores de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em μm .

Condição clínica	Hábito	
	NF (n = 10)	F (n = 10)
S (n = 10)	647,84 \pm 26,71 Aa	634,41 \pm 3,52 Aa
G (n = 10)	643,10 \pm 8,71 Aa	655,86 \pm 26,17 Aa

ANOVA ($p < 0,05$). Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si.

Na coluna, médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si.

Tabela 6: Média e desvio padrão do perímetro da superfície interna (PSI) do epitélio em pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), portadores de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os valores estão expressos em μm .

Condição clínica	Hábito	
	NF (n = 10)	F (n = 10)
S (n = 10)	2257,46 \pm 326,86 Aa	20040,15 \pm 577,38 Aa
G (n = 10)	2342,60 \pm 527,03 Aa	2537,00 \pm 712,40 Aa

ANOVA ($p < 0,05$). Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si.

Na coluna, médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si.

DISCUSSÃO

A resposta inflamatória induzida a partir do biofilme bacteriano pode ser modificada pelos produtos do tabaco ³, entre eles a cotinina, derivado metabólico da nicotina que tem ação vasoconstritora periférica reduzindo os sinais clínicos de sangramento, vermelhidão e edema no tecido gengival ^{2, 3}. O aumento da temperatura local e os produtos de combustão do tabaco induzem o aumento da espessura epitelial das mucosas jugal e labial e da gengiva marginal ⁶.

O revestimento epitelial dessas mucosas é estratificado e queratinizado, entretanto, a mucosa jugal e a labial não apresentam projeções epiteliais pronunciadas. Na gengiva marginal a arquitetura epitelial é influenciada pela localização e demanda funcional ¹⁴.

Nos espécimes avaliados neste estudo, o estrato espinhoso ocupou cerca de 50% da espessura total do epitélio e os queratinócitos estavam separados por pequenos espaços intercelulares. Nos espécimes de pacientes fumantes o estrato córneo era mais evidente (Figura 3). Esses eventos são semelhantes aos descritos por DANIELS et al. ⁶ (1992).

Em algumas amostras provenientes de sítios com inflamação clínica, foi notada a presença de material semelhante ao glicogênio (Figura 4). Segundo KATCHBURIAM & ARANA ¹⁰ (1999), a inflamação pode interferir no processo de maturação epitelial e na conformação original dos tonofilamentos comprometendo a completa queratinização. Esses autores demonstraram a presença de material semelhante ao glicogênio no interior das células epiteliais indicando o distúrbio do processo de diferenciação celular.

A análise morfométrica mostrou aumento da espessura epitelial nos casos de saúde gengival quando comparada aos casos de gengivite nos pacientes fumantes e não fumantes sem diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre os grupos (Tabela 3). A inflamação gengival reduz a espessura epitelial que poderá ser acompanhada de ulceração ^{8, 11}.

Em nossos espécimes encontramos aumento da espessura da base epitelial nos pacientes fumantes (Tabela 4). Do ponto de vista clínico, esse aumento manifesta-se como área discretamente esbranquiçada.

Nossos resultados, apresentados nas tabelas 5 e 6, mostram que não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre os perímetros externo e interno independente das condições clínicas, entretanto, o perímetro epitelial interno foi maior nos casos de gengivite. O epitélio é um tecido avascular que depende do tecido conjuntivo subjacente. A inflamação provoca a desorganização do tecido conjuntivo, modifica o suprimento sanguíneo e dificulta a eliminação dos metabólitos presentes no tecido epitelial. Segundo HARA et al. ⁸ (1975), as

projeções epiteliais são mais freqüentes e intensas nos casos de inflamação gengival.

Nossos resultados mostraram que as alterações vasculares causadas pelo fumo levam ao aparecimento de projeções epiteliais pouco alongadas. Nos indivíduos fumantes jovens isso pode ter sido responsável pela não diferença estatística entre os valores da espessura epitelial maior.

CONCLUSÃO

Os fumantes jovens apresentaram maior espessura da base epitelial acompanhada do aumento da camada córnea independente do estado de saúde gengival. Esse aumento pode contribuir para a diminuição dos sinais inflamatórios no tecido gengival.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pela colaboração na análise estatística, ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, responsável Área de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral -FOP/Unicamp a Ana Cristina do Amaral Godoy pela colaboração no processamento histológico.

ABSTRACT

VILLAR, C. C.; LIMA, A. F. M. Smoking influence on marginal gingival epithelial thickness. Rev Odontol Univ São Paulo

Smokers patients show reduction of inflammatory clinical signs, such as gingival bleeding and gingival redness. These characteristics are associated with the local vasoconstriction and an increase in the gingival epithelial thickness. The purpose of this work was to evaluate the thickness of the marginal gingival oral epithelium in smokers and non-smokers, with clinically healthy gingivae or gingivitis. 20 biopsies were obtained from four different groups: Group I: no smokers with clinically healthy gingiva (n=5), Group II: no smokers with gingivitis (n=5), Group III: smokers with clinically healthy gingiva (n=5), Group IV: smokers with gingivitis (n=5). These biopsies were histologically processed, stained with H&E, and examined by using an image analyzing system (KS400) for the morphologic evaluation and quantification of the major epithelial thickness, the base epithelial thickness and the external and internal epithelial perimeter. The Tukey test was used for the data analysis at a significance level of $\alpha=0.05$. A greater epithelial thickness was observed in smokers independent of their gingival health situation, a fact that may contribute to the decrease in the inflammatory signs.

UNITERMS: gingivae; epithelial thickness; tobacco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGSTRÖM, J.; FLÖDERUS-MYRHED, B. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 11, n. 2, p. 113-116, Apr. 1983.

2. BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. **J Periodont Res**, v. 21, n. 6, p. 668-676, Nov. 1986.
3. BERGSTRÖM, J. *et al.* Influence of cigarette smoking on vascular reaction during experimental gingivitis. **Scand J Dent Res**, v. 96, n. 1, p. 34-39, Feb. 1988.
4. BERGSTRÖM, J. *et al.* Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. **Scand J Dent Res**, v. 98, n. 6, p. 497-503, Dec. 1990.
5. BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. Tobacco use as a risk factor. **J Periodontol**, v. 65, n. 5, p. 545-550, May. 1994.
6. DANIELS, T. E. *et al.* Reduction of Langerhans cells in smokeless tobacco-associated oral mucosal lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 21, n. 3, p. 100-104, Mar. 1992.
7. DANIELSEN, B. *et al.* Effect of cigarette smoking on the transition dynamics in experimental gingivitis. **J Clin Periodontol**, v. 17, n. 3, p.159-164, Mar. 1990.
8. HARA, K. *et al.* A correlation between microscopic numerical evaluation, clinical scoring and total collagen content in inflamed gingivae. **J Periodontol**, v. 46, n. 8, p. 459-464, Aug. 1975.
9. HABER, J. *et al.* Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. **J Periodontol**, v. 64, n. 1, p. 16-23, Jan. 1993

10. KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e Embriologia Oral. Texto- Atlas - correlações clínicas. 1. ed. São Paulo: Panamericana, 1999.
11. POLSON, A.M.; GREENSTEIN, G. CATON, J. Relationships between epithelium and connective tissue in inflamed gingiva. **J Periodontol**, v. 52, n. 12, p. 743-746, Dec. 1981.
12. PREBER, H.; KANT, T.; BERGSTRÖM, J. Cigarette smoking, oral hygiene and periodontal health in Swedish army conscripts. **J Clin Periodontol**, v. 7, n. 2, p. 106-113, Apr. 1980.
13. PREBER, H.; KANT, T.; BERGSTRÖM, J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. **Scand J Dent Res**, v. 94, n. 2, p. 102-108, Apr. 1986.
14. TEN CATE, A. R. Oral histology – Development, structure and function. 5. ed. St Louis : Mosby, 1998. p. 345-386.

2.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DOS LINFÓCITOS NA GENGIVITE DO FUMANTE

Prof. Cristina Cunha VILLAR*

Prof. Dr. Antonio Fernando MARTORELLI DE LIMA**

UNITERMOS: densidade ótica, profundidade de sondagem, tabaco, fumo.

RESUMO

Os efeitos cumulativos deletérios do fumo na saúde periodontal incluem alterações biológicas da resposta imunológica celular e humoral com efeito imunossupressor sistêmico e prejuízo para o hospedeiro. O estudo das populações celulares presentes no tecido gengival dos pacientes fumantes pode contribuir para o conhecimento dos mecanismos biológicos locais envolvidos no desenvolvimento da doença periodontal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi especificar e quantificar as células inflamatórias encontradas na gengiva clinicamente saudável e na gengivite, de pacientes fumantes e não fumantes. Foram obtidas 20 biópsias de tecido gengival marginal, que foram divididas em 4 grupos, de acordo com as características clínicas e o hábito do tabagismo do doador. Grupo I: não fumante com gengiva clinicamente saudável (n=5), II: não fumante com gengivite (n=5), III: fumante com gengiva clinicamente saudável (n=5), IV: fumante com gengivite (n=5). Após processamento histológico de rotina, foram obtidos cortes de 3µm que foram utilizados nas reações de imuno-histoquímica para identificação de linfócitos B (CD20), linfócitos T (CD3), linfócitos T citotóxicos (CD8) e macrófagos (CD68).

* Mestranda em Periodontia, Mestre em Estomatopatologia, FOP/Unicamp.

** Professor Associado, Departamento de Prótese e Periodontia, Área de Periodontia, FOP/Unicamp.

Embora nossos resultados possam ter sido influenciados pelo tamanho da amostra, idade dos pacientes e curto período de exposição ao tabaco, encontramos maior número de linfócitos T (CD3), linfócitos T citotóxicos (CD8) e linfócitos B (CD20) nos espécimes com gengivite, entretanto, não houve diferença estatística significativa entre pacientes fumantes e não fumantes, independente do estado de saúde.

INTRODUÇÃO

Os efeitos cumulativos deletérios do fumo na saúde periodontal incluem alterações biológicas da resposta imunológica celular e humoral, com efeito imunossupressor sistêmico e prejuízo para o hospedeiro (Mecklenburg e Grossi, 2000). Entre as alterações imunológicas sistêmicas podem ser citados o prejuízo da mobilização, quimiotaxia e função fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares, a alteração na proporção de linfócitos T com diminuição de linfócitos helper e aumento de linfócitos citotóxicos, e a diminuição da produção de anticorpos, principalmente IgG2, principal imunoglobulina responsável pela opsonização de periodontopatógenos (Mecklenburg e Grossi, 2000). Essas alterações relativas ao tabagismo permitem que os microrganismos escapem dos mecanismos específicos e inespecíficos de defesa, tornando maior o risco, frequência e severidade da doença periodontal nos fumantes (Haber, 1994).

Os mecanismos imunológicos estão diretamente relacionados a patogênese das doenças periodontais (Cole, Seymour e Pewell, 1987). Técnicas imuno-histoquímicas aplicadas nas populações celulares presentes no tecido gengival,

podem ser usadas para distinguir as diferentes doenças periodontais (Seymour et al., 1983; Kinane, 1991) e podem indicar o segmento do sistema imune mais envolvido nessas situações (Seguier et al., 1999).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi especificar e quantificar os linfócitos B, linfócitos T, linfócitos T citotóxicos e macrófagos na gengiva clinicamente saudável e na gengivite de pacientes fumantes e não fumantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos pacientes

Foram selecionados 20 pacientes adultos jovens (20 a 35 anos de idade), com características clínicas de saúde gengival (índice gengival grau 0 de Løe & Silness, 1964) ou de gengivite (índice gengival grau II de Løe & Silness, 1964) e indicação para terapia periodontal cirúrgica de finalidade protética. Os pacientes, 10 não fumantes e 10 fumantes, foram divididos em grupos I (n=5): não fumante com gengiva clinicamente saudável, II (n=5): não fumante com gengivite, III (n=5): fumante com gengiva clinicamente saudável, IV (n=5): fumante com gengivite (Tabela 1). Foram considerados fumantes ⁷ os indivíduos que utilizassem 10 ou mais cigarros por dia, por no mínimo 5 anos (Tabela 2).

Foram excluídos da amostra os ex fumantes, pacientes com bolsa periodontal ou perda óssea identificadas em exames clínico e radiográfico, gestantes, indivíduos com alterações sistêmicas ou anormalidades imunológicas detectadas em exames físicos e laboratoriais, ou que fizeram uso de qualquer droga nas 4 semanas que antecederam o experimento.

Tabela 1. Informações clínicas correspondentes aos pacientes.

Grupo	Paciente	Idade	Gênero	Localização
I	1	32	M	13 palatina
	2	23	F	36 vestibular
	3	26	F	26 palatina
	4	22	F	26 palatina
	5	26	F	25 palatina
II	1	29	M	25 palatina
	2	22	F	14 palatina
	3	20	F	37 lingual
	4	32	F	26 palatina
	5	35	F	26 palatina
III	1	35	M	44 vestibular
	2	28	F	16 palatina
	3	27	M	25 palatina
	4	32	M	26 palatina
	5	21	F	16 palatina
IV	1	30	M	25 palatina
	2	35	F	25 palatina
	3	34	F	46 lingual
	4	22	F	16 palatina
	5	28	F	17 palatina

M = masculino, F = feminino, I = pacientes não fumantes com saúde gengival, II = pacientes não fumantes com gengivite, III = pacientes fumantes com saúde gengival, IV = pacientes fumantes com gengivite.

Tabela 2: Características referentes ao hábito e consumo de cigarros.

Grupo	Hábito		Valor de p
	III (n=5)	IV (n=5)	
Consumo Diário	17 ± 8,37	15 ± 3,54	0,59
Duração do Hábito	9,8 ± 3,49	8,8 ± 2,39	0,27
Exposição Total	173 ± 83,72	146 ± 55,50	0,15

III = pacientes fumantes com saúde gengival, IV = pacientes fumantes com gengivite.

Teste t de Student - considerando o nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Obtenção e processamento do material

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp sob protocolo no 076/2001, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS de 10/10/96 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento formal e esclarecido.

A biópsia foi obtida durante a execução do procedimento cirúrgico previamente planejado e permitiu a obtenção das amostras do tecido gengival marginal com dimensões mínimas de 4,0 mm por 2,0 mm de diferentes regiões da cavidade bucal ³ (Tabela 1). Segundo o protocolo pré cirúrgico, a anti-sepsia intrabucal foi realizada com bochecho de digluconato de clorexidina a 0,2% por 1 minuto, a extrabucal com iodo-povidine e a técnica anestésica transcorreu segundo a localização do sítio cirúrgico.

Análise imuno-histoquímica

Após processamento histológico de rotina, foram obtidos cortes de 3,0 µm que foram utilizados na análise imuno-histoquímica para identificação dos linfócitos B, linfócitos T, linfócitos T citotóxicos e macrófagos. As reações foram padronizadas para cada anticorpo a partir do protocolo abaixo descrito.

Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em cadeia decrescente de etanol. Na seqüência, os cortes foram lavados com água oxigenada 10 volumes para remoção da peroxidase endógena, submersos em solução tampão de ácido cítrico 6% e expostos a dois ciclos de 12 minutos em forno de

microondas. Na etapa seguinte, todos os cortes foram incubados com albumina bovina a 1%, em diluição 1:20 por 30 minutos em tampão PBS para reduzir a união inespecífica dos anticorpos. Posteriormente, os cortes foram incubados separadamente com os anticorpos primários anti-CD20, anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD68 previamente diluídos em solução de PBS (Tabela 3). Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados com PBS, expostos aos anticorpos secundários do Kit Duet líquido em PBS 1/500 por 30 minutos, lavados com PBS e expostos ao complexo Estreptavidina do Kit Duet diluído em PBS 1/1500 (ABC, Dakapatts, Denmark) por 30 minutos. A revelação da reação foi feita com 30 mg de diaminobenzidina (SIGMA) diluída em PBS, acrescida de 1,0 ml de água oxigenada 20 volumes. Após essa etapa, os cortes foram lavados e contra corados com hematoxilina de Carazzi, submetidos à nova lavagem, desidratação, diafanização e montagem em lâmina de vidro. Foram incluídos controles positivos e negativos para todas as reações. Os controles negativos foram obtidos com a omissão do anticorpo primário.

O padrão de marcação imuno-histoquímico foi analisado individualmente em microscópio com câmara de vídeo acoplada que permitiu a análise quantitativa das células alvo pelo sistema de análise de imagem Kontron S 400[®]x. Os cortes foram divididos em quatro regiões: epitélio do sulco, epitélio oral e tecido conjuntivo subjacente. Para a quantificação foi utilizado aumento de 400x, realizadas 3 leituras em campo de 0,0049 mm² e calculada a média de células

* Kontron Elektronik, München, Germany

positivas. As médias para cada região foram submetidas à análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis ANOVA by ranks.

Tabela 3: Anticorpos primários e suas especificidades, diluições e forma de digestão.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Digestão
CD3	Linfócitos T	1:500	Ácido cítrico 6% em microondas
CD8	Linfócito T – citotóxico	1:100	Ácido cítrico 6% em microondas
CD20	Linfócitos B	1:10.000	Ácido cítrico 6% em microondas
CD68	Monócitos, macrófagos	1:400	Ácido cítrico 6% em microondas

RESULTADOS

As células inflamatórias foram encontradas em quantidades variáveis, sendo grande a diferença entre as amostras e entre as diferentes regiões da mesma amostra.

A área de maior acúmulo de células inflamatórias foi o tecido conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco (Tabelas 4, 5, 6, 7) na qual o infiltrado inflamatório era predominantemente composto por linfócitos T e B.

A marcação imuno-histoquímica revelou a presença de linfócitos T, células CD3 positivas, em todas as amostras. No interior do tecido epitelial os linfócitos T estavam presentes nas camadas basal e parabasal. De forma geral, o número de células T presentes no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco foi maior do que o encontrado na região correspondente ao epitélio oral. Não houve diferença estatística entre o número de células marcadas nos quatro grupos, entretanto, no epitélio do sulco, os linfócitos T eram mais numerosos nas condições de gengivite (GII e GIV) (Figura 1) (Tabela 4).

Os linfócitos T citotóxicos intra-epiteliais, células CD8 positivas, foram mais abundantes nas condições de gengivite (Figura 2) (GII e GIV), entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco e oral (Tabela 5).

Os linfócitos B, células CD20 positivas, foram encontrados em maior quantidade no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco. No tecido conjuntivo subjacente aos epitélio oral e no epitélio do sulco. Houve diferença estatística significativa no número de linfócitos B nos casos de gengivite (Figura 3) independente do hábito do fumo (Tabela 6).

Os macrófagos, células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 (Figura 4), estiveram presentes em quantidades iguais nos 4 grupos de estudo, independente da região analisada, entretanto, foi encontrado maior acúmulo destas células no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco (Tabela 7).

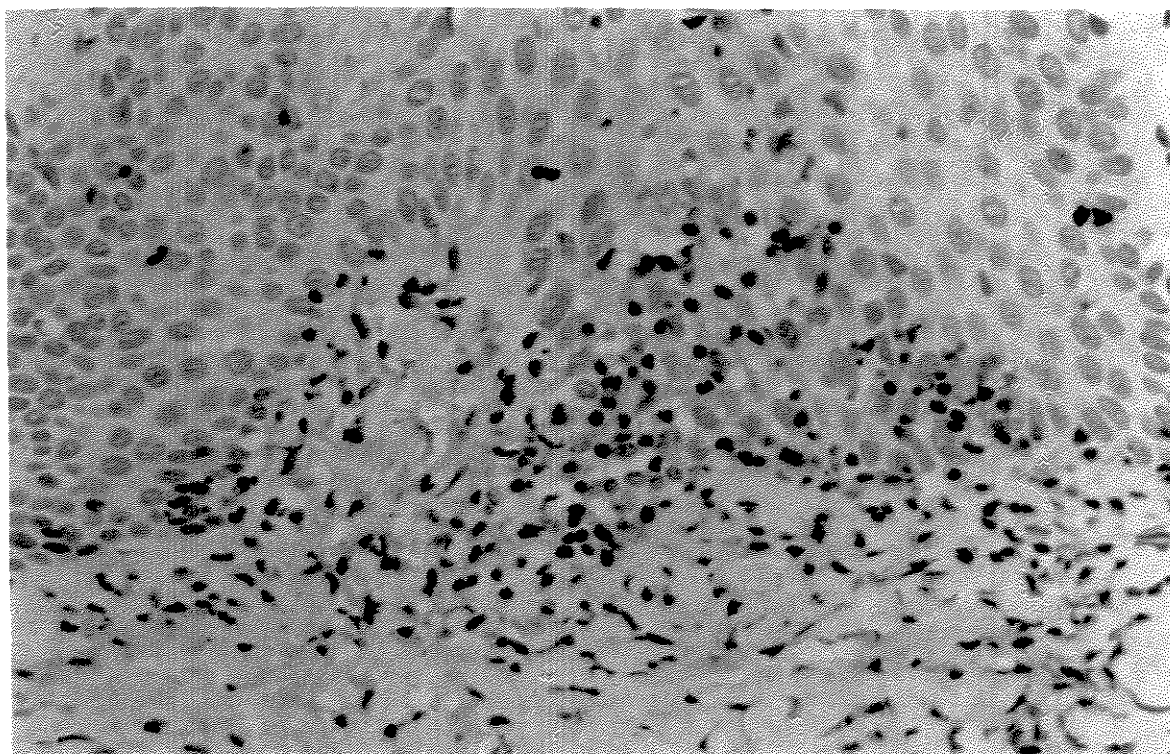


Figura 1: Nota-se a presença de linfócitos T, CD3 positivos, no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio oral da gengiva marginal de indivíduo não fumante (imunoperoxidase-40x).

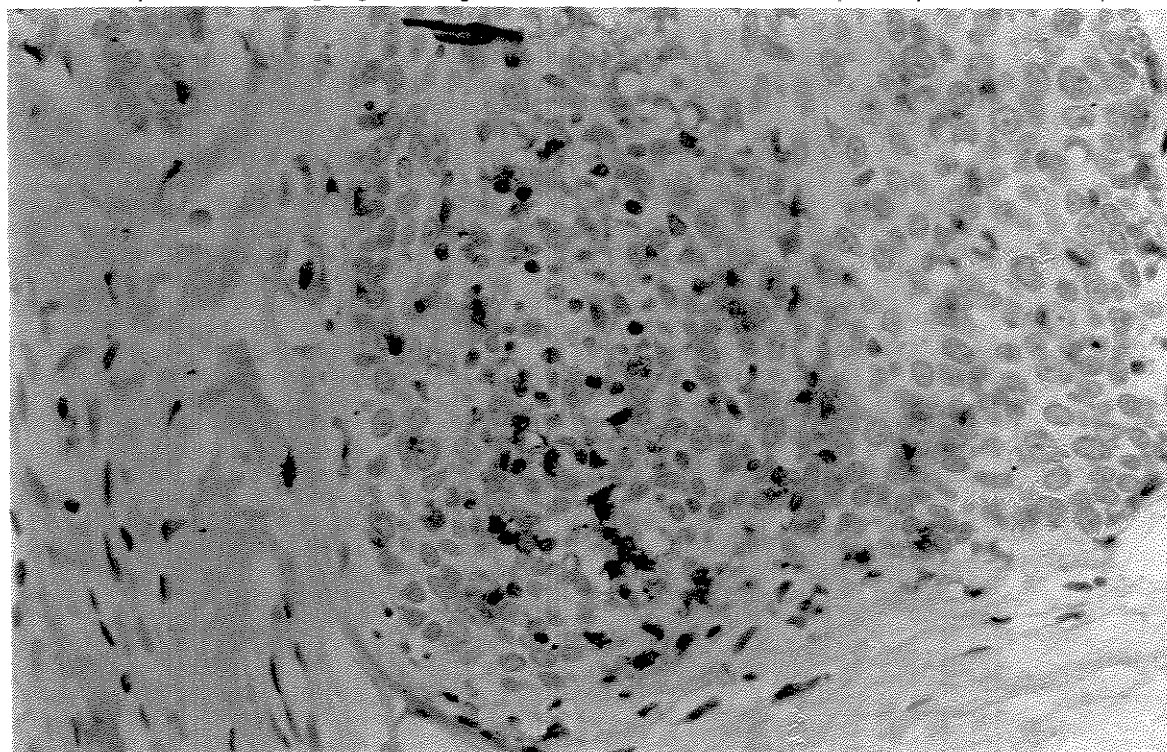


Figura 2: Nota-se a presença de linfócitos T citotóxicos, CD8 positivos, na interface epitélio oral - tecido conjuntivo da gengiva marginal de indivíduo fumante (imunoperoxidase-40x).

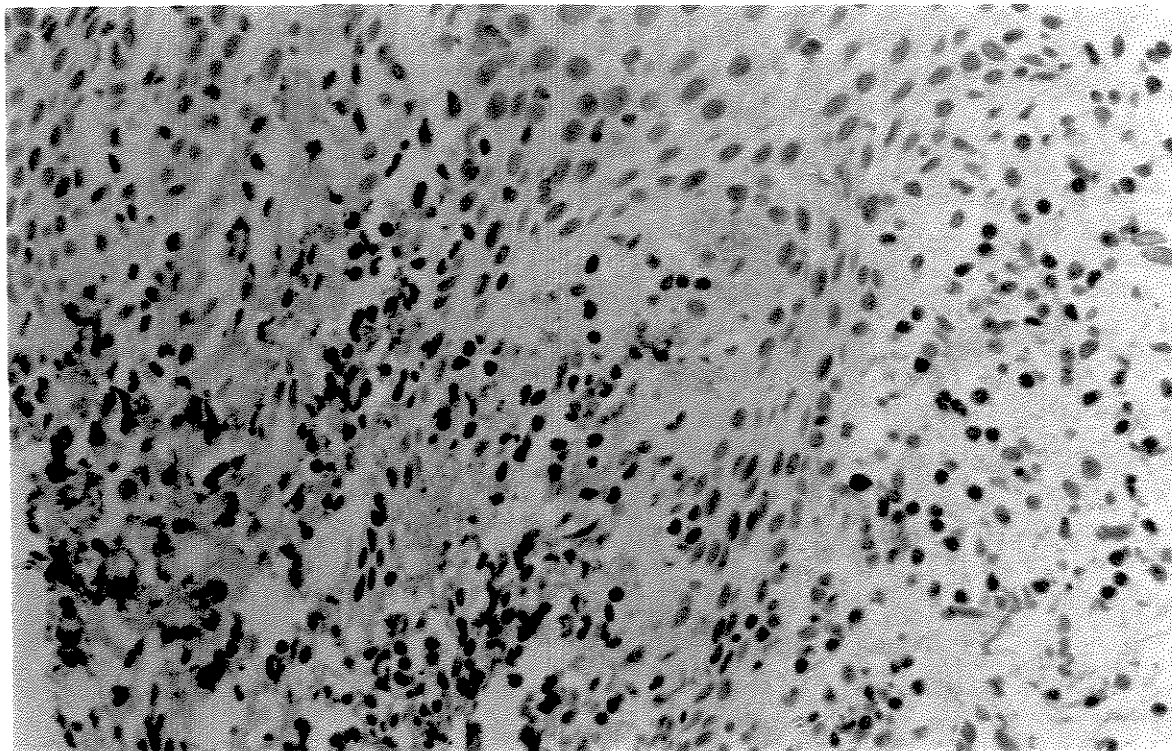


Figura 3: Nota-se a presença de linfócitos B, CD20 positivos, no interior do tecido conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco da gengiva marginal de sítio com sinais clínicos de inflamação

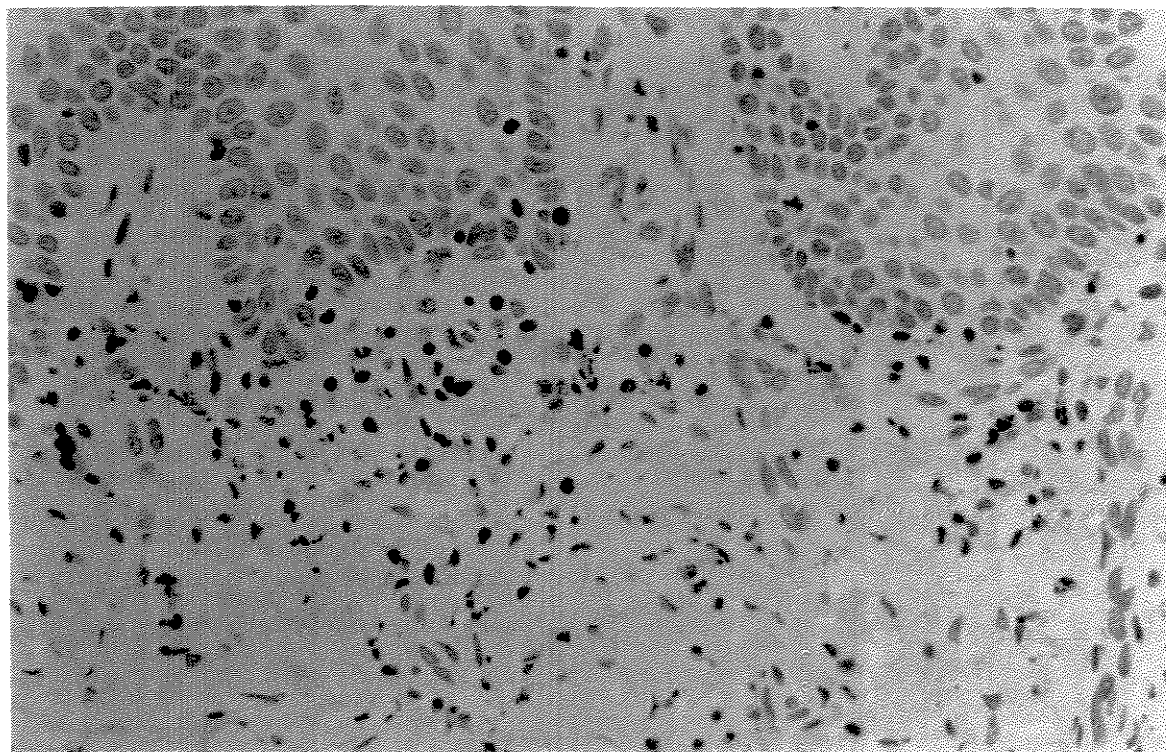


Figura 4: Nota-se a presença de macrófagos, células CD68 positivas, no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio oral da gengiva marginal de indivíduo fumante (imunoperoxidase-40x).

Tabela 4: Número de células CD3 positivas encontradas no tecido gengival de pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), portadores de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os dados expressam as médias das contagens em 5 campos de 0,032 mm², no epitélio oral, epitélio do sulco e nos tecidos conjuntivos subjacentes, num aumento de 400x.

Compartimento	Grupos			
	NF-S (n=5)	NF-G (n=5)	F-S (n=5)	F-G (n=5)
EO	1,00 ± 1,00 a	2,27 ± 1,17 a	2,20 ± 2,17 a	3,06 ± 2,56 a
TCO	4,95 ± 7,60 a	16,93 ± 17,26 a	4,53 ± 2,18 a	11,67 ± 10,77 a
ES	1,20 ± 1,04 b	3,10 ± 0,96 ab	1,40 ± 0,82 b	5,20 ± 2,25 a
TCS	9,4 ± 7,91 a	25,3 ± 13,27 a	7,2 ± 11,12 a	19,4 ± 8,17 a

EO= epitélio oral, TCO = tecido conjuntivo oral, ES = epitélio sulcular, TCS = tecido conjuntivo sulcular. Kruskal-Wallis (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

Tabela 5: Número de células CD8 positivas encontradas no tecido gengival de pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), portadores de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os dados expressam as médias das contagens em 5 campos de 0,032 mm², no epitélio oral, epitélio do sulco e nos tecidos conjuntivos subjacentes, num aumento de 400x.

Compartimento	Grupos			
	NF-S (n=5)	NF-G (n=5)	F-S (n=5)	F-G (n=5)
EO	0,60 ± 0,28 bc	1,53 ± 0,90 ab	0,50 ± 0,64 c	2,53 ± 1,61 a
TCO	1,80 ± 1,72 a	4,80 ± 5,38 a	2,00 ± 1,44 a	6,27 ± 6,48 a
ES	0,40 ± 0,37 b	1,67 ± 1,30 ab	1,00 ± 0,00 b	4,00 ± 2,32 a
TCS	2,9 ± 1,47 a	7,4 ± 7,14 a	4,42 ± 0,12 a	7,17 ± 3,01 a

EO= epitélio oral, TCO = tecido conjuntivo oral, ES = epitélio sulcular, TCS = tecido conjuntivo sulcular. Kruskal-Wallis (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

Tabela 6: Número de células CD20 positivas encontradas no tecido gengival de pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), portadores de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os dados expressam as médias das contagens em 5 campos de 0,032 mm², no epitélio oral, epitélio do sulco e nos tecidos conjuntivos subjacentes, num aumento de 400x.

Compartimento	Grupos			
	NF-S (n=5)	NF-G (n=5)	F-S (n=5)	F-G (n=5)
EO	0,00 ± 0,00 a	0,48 ± 0,38 a	0,15 ± 0,34 a	0,33 ± 0,26 a
TCO	0,38 ± 0,44 b	1,25 ± 0,40 a	0,33 ± 0,41b	0,80 ± 0,68 ab
ES	0,10 ± 0,22 b	0,70 ± 0,45 ab	0,40 ± 0,42 b	1,74 ± 1,57 a
TCS	4,7 ± 3,49 a	31,20 ± 41,59 a	2,90 ± 3,76 a	23,60 ± 35,73 a

EO = epitélio oral, TCO = tecido conjuntivo oral, ES = epitélio sulcular, TCS = tecido conjuntivo sulcular. Kruskal-Wallis (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si. Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

Tabela 7: Número de células CD68 positivas encontradas no tecido gengival de pacientes não fumantes (NF) e fumantes (F), portadores de saúde clínica (S) e gengivite (G). Os dados expressam as médias das contagens em 5 campos de 0,032 mm², no epitélio oral, epitélio do sulco e nos tecidos conjuntivos subjacentes, num aumento de 400x.

Compartimento	Grupos			
	NF-S (n=5)	NF-G (n=5)	F-S (n=5)	F-G (n=5)
EO	0,50 ± 0,43 a	1,65 ± 2,21 a	0,20 ± 0,45 a	0,95 ± 0,74 a
TCO	6,25 ± 2,61 a	6,35 ± 3,77 a	5,55 ± 3,04 a	7,70 ± 3,56 a
ES	1,60 ± 0,42 a	2,80 ± 1,90 a	1,33 ± 1,53 a	2,88 ± 2,84 a
TCS	7,70 ± 4,65 a	13,00 ± 2,78 a	11,12 ± 3,58 a	14,60 ± 4,83 a

EO = epitélio oral, TCO = tecido conjuntivo oral, ES = epitélio sulcular, TCS = tecido conjuntivo sulcular. Kruskal-Wallis (p<0,05). Na linha, médias seguidas de letras semelhantes não diferem entre si.

DISCUSSÃO

As alterações microbiológicas, citotóxicas e das respostas imunológicas e inflamatórias provocadas pelo tabagismo interferem nos sinais clínicos, na severidade e no resultado da terapia periodontal (Harber, 1994; Mecklenburg e Grossi, 2000). Diversos estudos tentaram determinar o efeito do tabaco nos

tecidos periodontais, relacionando o hábito do fumo com a redução dos sinais inflamatórios, com a maior gravidade da doença periodontal, com o maior número de dentes perdidos e com o fracasso da terapia periodontal (Arno et al., 1959; Bergström e Floderus-Myrhed, 1983; Cuff et al., 1989; Bergström e Preber, 1994; Grossi et al., 1997). Embora as evidências clínicas confirmem o efeito do fumo, o mecanismo pelo qual o cigarro interfere na saúde periodontal ainda permanece desconhecido (Haber, 1994). Dentre as ações citotóxicas dos componentes do tabaco podem ser citados alterações nas funções dos fibroblastos, imunossupressão e nas células imunes e ósseas (Haber, 1997; Mecklenburg e Grossi, 2000). Anticorpos monoclonais têm sido utilizados para identificar essas alterações nas diferentes formas de doenças periodontais (Seymour et al., 1983; Kinane, 1991).

Neste estudo utilizamos a identificação imuno-histoquímica e a quantificação de células imunológicas em amostras de tecido gengival com saúde ou gengivite provenientes de pacientes fumantes e não fumantes, a fim de melhor entender os mecanismos biológicos locais envolvidos no estabelecimento da doença periodontal. Nossos resultados mostraram a presença de macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e linfócitos T citotóxicos em todas as amostras. A maior concentração dessas células foi encontrada no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco, tanto no estado de saúde clínica como na gengivite. Segundo Lindhe (1999), essas células estariam envolvidas na manutenção da integridade e na defesa local dos tecidos periodontais.

Séguier et al (1999) verificaram a presença de células inflamatórias no interior do epitélio oral. Da mesma forma, encontramos a presença de linfócitos T, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e macrófagos no interior do epitélio oral e do sulco, o que sugere a importância do epitélio não somente como barreira mecânica contra antígenos, mas o seu papel imune na eliminação de elementos patogênicos. Segundo Bartold et al (200) o epitélio é capaz de produzir IL-2 e IL-8 em resposta ao acúmulo do biofilme bacteriano.

Embora presentes no compartimento epitelial, a maior quantidade das células inflamatórias foi encontrada no tecido conjuntivo, principalmente nos casos de gengivite, onde o infiltrado inflamatório ocupou a área do colágeno degradado. A maior quantidade de linfócitos B e os linfócitos T citotóxicos nos espécimes com gengivite (Tabelas 4, 5 e 6) pode ser explicada pelo aumento da produção de interleucinas e da expressão de moléculas de adesão em resposta aos produtos tóxicos do biofilme bacteriano (Lindhe, 1999; Bartold et al, 2000). Os linfócitos T atuam diretamente produzindo linfocinas que induzem a imunidade mediada por células e auxiliam na diferenciação e proliferação dos linfócitos B, responsáveis pela síntese de anticorpos específicos contra esses microorganismos (Lindhe, 1999).

Não houve diferença estatística significativa entre o número de macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e linfócitos T citotóxicos presentes na gengiva marginal de pacientes fumantes e não fumantes, independentemente do estado de saúde clínica. A presença dessas células no tecido gengival é determinada e mediada principalmente por fatores quimiotáticos e moléculas de adesão que são

produzidos pelo hospedeiro em resposta ao biofilme bacteriano (Lindhe, 1999; Bartold et al , 2000). Quanto maior o acúmulo de placa mais pronunciado torna-se o infiltrado inflamatório (Bartold et al , 2000).

Os efeitos citotóxicos do fumo são descritos como cumulativos - em nosso estudo a ausência da influência sobre o número de células inflamatórias presentes na gengiva marginal pode ser explicada pela idade reduzida dos pacientes que apresentaram no máximo 35 anos, e pelo curto período médio de exposição ao tabaco.

CONCLUSÃO

O fumo exerce influência em diversos mecanismos biológicos. Embora nosso estudo não tenha verificado diferença no número de células imunes presentes nos tecidos periodontais de pacientes fumantes e não fumantes, a avaliação funcional destas células e o desenvolvimento de estudos com populações mais adultas podem contribuir para a melhor compreensão da patogênese da doença periodontal.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Gláucia Maria Bovi Ambrosano pela colaboração na análise estatística, ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, responsável pelo Laboratório de Histopatologia da Área de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral -FOP / Unicamp a Ana Cristina do Amaral Godoy pela colaboração no processamento histológico.

ABSTRACT

VILLAR, C.C; LIMA, A.F. M. Immunohistochemical and morphometric analysis of lymphocytes in smoker's with gingivitis

The deleterious effects of smoking on periodontal health, including biologic alterations of celular and humoral immunologic response, cause systemic immunosupressioin and prejudice to the host. The study of the cellular populations present in smoker's gengival tissues can contribute to a better understanding of the local biologic mechanisms involved in periodontal diseases. Therefore, the purpose of this study was to evaluate and quantify the inflammatory cells present in gingival tissues in smokers and non-smokers. 20 biopsies obtained during surgical procedures were divided into 4 groups of 5 specimens each. Group I: no smokers with clinically healthy gingiva (n=5), Group II: no smokers with gingivitis (n=5), Group III: smokers with clinically healthy gingiva (n=5), Group IV: smokers with gingivitis (n=5). After the rotine histologic procedures, 3 μ m slides were obtained for immuno-histochemical reactions in order to identify B lymphocytes (CD20), T lymphocytes (CD3), T cytotoxic lymphocytes (CD8) and macrophage (CD68). Although our results might have been influenced by the sample size, by the young age of the patients and by the short time of smoking exposure, we found a higher number of T lymphocytes (CD3), T cytotoxic lymphocytes (CD8) and B lymphocytes (CD20) in the specimens with gingivitis. There was no difference in relation to the number of these cells present in the marginal gengival tissues in smokers or non smokers, independent of their clinical health status.

UNITERMS: Gingivitis. immunology; inflammation, lymphocytes, smoking

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARNO, A. *et al.* Alveolar bone loss as a function of tobacco consumption. *Acta Odontol Scand*, 1959; 17: 3-9.
2. BARTOLD, P.M.; WALSH, L.J.; NARAYANAN, A.S. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000*, 2000; 24: 28-55.
3. BERGSTRÖM, J.; FLODERUS-MYRHED, B. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol*, 1983; 11: 113-116.
4. BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodont Res*, 1986; 21: 668-676.
5. BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol*, 1994; 65: 545-550.
5. CUFF, M. J. *et al.* The presence of nicotine on the root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol*, 1989; 60: 564-569.
6. GROSSI, S. G. *et al.* Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. *J Am Dent Assoc*, 1997; 128: 599-607.
7. HABER, J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Current Opinion in Periodontology*, 1994: 12-18.
8. MARTINEZ-CANUT, P.; LORCA, A.; MAGÁN, R. Smoking and periodontal disease severity. *J Clin Periodontol*, 1995; 22: 743-749..
8. MECKLENBURG, R. E. & GROSSI, S. G. *Periodontal Medicine*, Rose L F 2000. Tobacco use and intervention Chapter 7: 99-119.

3. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem extrapolar as seguintes conclusões:

1. Os pacientes fumantes apresentaram maior espessura da base epitelial, que foi acompanhada pelo aumento da camada córnea, independente do estado de saúde gengival.
2. A profundidade de sondagem foi maior nos dentes inferiores dos pacientes fumantes, principalmente naqueles com gengivite.
3. Não houve diferença estatística significativa entre a densidade ótica e o nível da crista óssea alveolar verificados em pacientes fumantes e não fumantes, independente da condição clínica.
4. Não houve diferença estatística significativa entre o número de macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e linfócitos T citotóxicos presentes na gengiva marginal de pacientes fumantes e não fumantes, independentemente do estado de saúde clínica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ARNO, A. *et al.* Alveolar bone loss as a function of tobacco consumption. *Acta Odontol Scand*, Oslo, v.17, p. 3-9. 1959.
2. BERGSTRÖM, J. Short-term investigation on the influence of cigarette smoking upon plaque accumulation. *Scand J Dent Res*, Copenhagen, v. 89, n. 3, p.235-238, Jun. 1981.
3. BERGSTRÖM, J.; FLODERUS-MYRHED, B. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol*, Copenhagen, v. 11, p. 113-116, 1983.
4. BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodont Res*, Copenhagen, v. 21, n. 6, p. 668-676, Nov. 1986.
5. BERGSTRÖM, J.; ELIASSON, S. Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodont Res*, Copenhagen, v.22, n. 6, p. 513- 517. Nov. 1987.
6. BERGSTRÖM, J. *et al.* Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. *Scand J Dent Res*, Copenhagen, v. 98, p. 497-503, 1990.
7. BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol*, Chicago, v. 65, n. 5, p. 545-550, Dec. 1994.

* De acordo com a NBR 6023, de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. CUFF, M. J. et al, The presence of nicotine on the root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol*, Chicago, v.60, n. 10, p. 564-569, Oct. 1989.
9. FELDMAN, R.S.; BRAVACOS, J.S.; ROSE, C.L. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol*, Chicago, v. 54, n. 8, p. 481-485, Aug. 1983
10. GROSSI, S.G. et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*, Chicago, v.65, n. 3, p. 260-267, Mar. 1994
11. GROSSI, S. G. et al. Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. *J Am Dent Assoc*, Chicago, v.128, n. 5, p. 599-607, May. 1997.
12. HABER, J. et al. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol*, Chicago, v. 64, n. 1, p. 16-23, Jan. 1993
13. HANES, P. J.; SCHUSTER, G. S.; LUBAS, S. Binding uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol*, Chicago, v. 62, n. 2, p. 142-147, feb. 1991.
14. LINDHE, J. Tratado de Periodontia e Implantodontia Oral, 1999 Guanabara Koogan, 3 ed. Rio de Janeiro.
15. MCGUIRE, J R et al. Cotinine in saliva and subgingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J Periodontol*, Chicago, v. 60, n.4, p. 176-181, Apr. 1989.

16. MECKLENBURG, R. E. & GROSSI, S. G. Periodontal Medicine, Rose L F 2000. Tobacco use and intervention chapter 7, 99-119p.
17. MILLER, P. D. Jr. Root coverage with the free gingival graft: factors associated with incomplete coverage. *J Periodontol*, Chicago, v. 58, n. 10, p. 674-681, Oct. 1987.
18. PREBER, H.; KANT, T.; BERGSTRÖM, J. Cigarette smoking, oral hygiene and periodontal health in Swedish army conscripts. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 106-113, Apr. 1980.
19. PREBER, H.; BERGSTROM, J. The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and nonsmokers. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v. 13, n. 4, p. 319-323, Apr. 1986.
20. RAULIN, L. A. et al. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surface in vitro. *J Periodontol*, Chicago, v. 59, n. 5, p. 318-325, May. 1988.
21. ROSENBERG, E. S.; CUTLER, A. S. The effect of cigarette smoking on the long-term success of guided tissue regeneration: a preliminary study. *Ann R Austral Coll Dent Surg*, v. 12, p. 89-93, Apr. 1994.
22. STOLTENBERG, J. L. et al. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol*, Chicago, v.64, n. 12, p. 1225-1230, Dec. 1993.
23. TONETTI, M. S.; PINI-PRATO, G.; CORTELLINI, P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects: a

preliminary retrospective study. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v. 22, n. 3, p. 229-234, Mar. 1995.

24. ZAMBON, J. J. *et al.* Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*, Chicago, v. 67, n.10, p. 1050-10514, Oct. 1996.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações dispostas neste termo foram fornecidas por Fernanda da Roz Rodrigues (Executora do projeto) e Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima (Orientador), para estabelecer acordo formal por escrito, através do qual o indivíduo objeto da pesquisa, ou seu responsável, autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I - Título do projeto de pesquisa:

Avaliação Radiográfica de Perda Óssea Alveolar Precoce em Pacientes Fumantes e Não-Fumantes

II - Objetivo:

O objetivo deste trabalho será investigar o efeito do hábito de fumar sobre a densidade da crista óssea alveolar em pacientes adultos jovens com inflamação gengival.

III- Justificativa:

Os pacientes fumantes freqüentemente apresentam doença periodontal mais severa e recorrente do que a observada na população não fumante. A identificação precoce da doença pode favorecer estes pacientes.

IV - Procedimentos clínicos:

Os voluntários serão separados em fumantes e não fumantes a partir dos dados obtidos em um questionário inicial.

Posteriormente será realizado um exame clínico, no qual serão atribuídos valores para a quantidade de placa e inflamação gengival presentes, Índice de Placa e Índice Gengival respectivamente. Bem como a Profundidade de Sondagem e Nível Clínico de Inserção, que fornecem informações quanto ao suporte do dente. Tais avaliações permitirão diagnosticar e classificar aqueles que apresentam saúde gengival e aqueles que apresentam gengivite.

A avaliação será realizada nos seguintes dentes: primeiro molar superior direito, incisivo central superior direito, primeiro pré-molar superior esquerdo, primeiro molar inferior esquerdo, incisivo central inferior esquerdo e primeiro pré-molar inferior direito. A Profundidade de Sondagem e o Nível de Inserção Clínico serão realizados com o auxílio de sonda computadorizada, e será realizada nos mesmo

seis dentes citados anteriormente.

A seguir, serão realizadas as tomadas radiográficas digitalizadas, para análise da densidade óssea ao redor dos 6 dentes selecionados para o estudo.

V - Desconforto ou risco esperados:

O exame irá realizar procedimentos de rotina clínica para diagnóstico periodontal, portanto, não há riscos envolvidos. O desconforto proporcionado pelos exames será semelhante ao experimentado durante o exame odontológico de rotina, sendo ele mínimo.

VI – Benefícios esperados:

Os exames propostos permitem a identificação precoce de eventuais lesões periodontais.

VII – Métodos alternativos existentes:

Em função da necessidade da obtenção de dados clínicos e imagens radiográficas, não há possibilidade de métodos alternativos.

VIII – Forma de acompanhamento e assistência:

Serão selecionados para o estudo pacientes que já estão em tratamento odontológico regular na Clínica de Graduação da FOP-UNICAMP.

IX – Direitos dos voluntários:

Todos os voluntários têm garantido o seu direito de receber esclarecimentos sobre a metodologia a ser empregada, antes e durante o curso do projeto. Além disso, todos os voluntários têm plena liberdade de recusa de participação ou de retirada do consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Os dados coletados e as informações pessoais são confidenciais para assegurar a privacidade dos participantes.

X- Liberdade de recusa:

Todos os voluntários têm direito e liberdade de se recusar a participar ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização e sem prejuízo algum.

XI- Garantia de sigilo:

Aos participantes é assegurada total privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

XII – Ressarcimento de despesas e formas de indenização:

Não haverá ônus material ou financeiro para os pacientes, não sendo necessário nenhum ressarcimento de despesa. No caso de eventuais danos decorrentes da

pesquisa, as formas de indenização serão definidas judicialmente no foro local, de acordo com a legislação vigente. Eventuais despesas feitas pelos pacientes com transporte e alimentação serão devidamente ressarcidas pela executora da pesquisa.

Dados que permitam ao voluntário entrar em contato com os pesquisadores em caso de emergência

Em caso de emergência, os voluntários poderão entrar em contato com a pesquisadora, Fernanda Da Roz Rodrigues, através dos seguintes telefones (19) 433 6474 (residência) ou (19) 430 5263 (Assistência Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP).

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP. Endereço - Av. Limeira, 901 - CEP/FOP - 13414-900 - Piracicaba - SP.

XIII – Consentimento formal para participação em pesquisa clínica:

Por este instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu, _____ (nome), _____ (nacionalidade), _____ (profissão), portador do RG _____, CIC _____, residente e domiciliado à _____, na cidade de _____, concordo com absoluta consciência dos procedimentos a que vou me submeter, nos termos relacionados nas disposições anteriores. Esclareço ainda que este consentimento não exime a responsabilidade do profissional que executará os procedimentos experimentais.

Por estar de acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Piracicaba, de _____ de 2001.

Assinatura do voluntário ou responsável _____

Assinatura do pesquisador _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações dispostas neste termo foram fornecidas por Cristina Cunha Villar (Mestranda em Clínica Odontológica na Área de Periodontia) e Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima (Orientador), para estabelecer acordo formal por escrito, mediante o qual o indivíduo objeto da pesquisa, ou seu responsável, autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I - Título do projeto de pesquisa:

Análise imuno-histoquímica e morfométrica dos linfócitos na gengivite do fumante

II - Objetivo:

O objetivo deste estudo será especificar e comparar a localização e quantificação de células inflamatórias tais como macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, linfócitos CD4 e CD8, na gengiva clinicamente saudável e na gengivite, de pacientes fumantes e não fumantes.

III - Justificativa:

Os pacientes fumantes apresentam alterações no sistema imune primário e secundário, e freqüentemente apresentam doença periodontal mais severa e recorrente do que a observada na população não fumante. A nicotina reduz os mecanismos de proteção, com redução de anticorpos e leucócitos. O estudo das populações celulares presentes no tecido gengival destes pacientes contribui para o melhor conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos.

IV - Procedimentos clínicos:

As biópsias da margem gengival serão obtidas durante a realização de cirurgias de restabelecimento de espaço biológico, gengivectomia, gengivoplastia, quando estas forem indicadas. A anti-sepsia bucal será realizada com bochecho com digluconato de clorexidina a 0,2% por 1 minuto. A anestesia será obtida por infiltração local. Cada biópsia será obtida por duas incisões verticais paralelas unidas por uma incisão horizontal. Apenas uma amostra será selecionada por paciente.

V - Desconforto ou risco esperados:

O procedimento proposto pode ocasionar desconforto pós-operatório inerente as cirurgias periodontais, sendo facilmente suportado com terapia analgésica. No

paciente não será testado nenhum tipo de material. Somente o tecido extraído servirá como objeto de estudo.

VI - Benefícios esperados:

As biópsias somente serão realizadas em locais indicados para cirurgia periodontal ou exodontia. Por esta razão, o benefício esperado é totalmente pertinente ao tratamento indicado.

VII - Métodos alternativos existentes:

Em função da necessidade da execução da biópsia da margem gengival, não há possibilidade de métodos alternativos.

VIII - Forma de acompanhamento e assistência:

Os pacientes receberão acompanhamento na semana pós-operatória, sob a responsabilidade do executor deste projeto (Cristina Cunha Villar).

IX - Direitos dos voluntários:

Todos os voluntários têm garantido o seu direito de receber esclarecimentos sobre a metodologia a ser empregada, antes e durante o curso do projeto. Além disso, todos os voluntários têm plena liberdade de recusa de participação ou de retirada do consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Os dados coletados e as informações pessoais são confidenciais para assegurar a privacidade dos participantes.

X - Liberdade de recusa:

Todos os voluntários têm direito e liberdade de se recusar a participar ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

XI - Garantia de sigilo:

Aos participantes é assegurada a total privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa

XII - Ressarcimento de despesas e formas de indenização:

Não haverá ônus material ou financeiro para os pacientes, não sendo necessário nenhum ressarcimento de despesa. No caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa, as formas de indenização serão definidas judicialmente no foro local, de acordo com a legislação vigente. Eventuais despesas feitas pelos pacientes serão devidamente ressarcidas pelo executor da pesquisa.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP. Endereço - Av. Limeira, 901 - CEP/FOP - 13414-900 - Piracicaba – SP.

XIII - Consentimento formal para participação em pesquisa clínica:

Por este instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu, _____(nome), _____(nacionalidade), _____(profissão), portador do RG _____, CIC _____, residente e domiciliado à _____, na cidade de _____, concordo com absoluta consciência dos procedimentos a que vou me submeter, nos termos relacionados nas disposições anteriores. Esclareço ainda que este consentimento não exime a responsabilidade do profissional que executará os procedimentos experimentais.

Por estar de acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Piracicaba, ____ de _____ de 2001.

Assinatura do voluntário ou responsável _____

Assinatura do pesquisador _____